

ISSN 0355-1180

HELSINGIN YLIOPISTO

Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta

Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto

EKT-sarja 1914

**UHPLC-PDA -MENETELMÄN KEHITYS JA VALIDOINTI
KAURAN AVENANTRAMIDIEN MÄÄRITYKSEEN**

Sharon Amanda Abderhalden

Helsinki 2019

Tiedekunta Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma Elintarviketieteiden maisteri
Tekijä Sharon Amanda Abderhalden		
Työn nimi UHPLC-PDA -menetelmän kehitys ja validointi kauran avenantramidien määrittämiseen		
Oppiaine/Opintosuunta Elintarvikekemian		
Työn laji Maisterintutkielma	Aika Lokakuu 2019	Sivumäärä 62
<p>Tiivistelmä</p> <p>Avenantramidit ovat kaurassa (<i>Avena sativa</i> L., <i>Poaceae</i>) esiintyviä hydroksikaneliantraniilihappoja, joissa antraniilihappo tai hydroksyloitu ja/tai metoksyloitu antraniilihapon johdannainen on konjugoituneena kanelihappoon amidisidoksella. Avenantramidiyhdisteitä on tunnistettu kaurasta yli 25 erilaista muotoa, joista yleisimmät ovat kuitenkin 5-hydroksiantraniilihapon ja kahvi-, ferula- tai p-kumaarihapon esterit 2c, 2f ja 2p. Avenantramideilla on todettu olevan hapettumista ja tulehduksia estäviä ominaisuuksia.</p> <p>Tällä hetkellä kiinnostus kauraan ja sen sisältämiin bioaktiivisiin yhdisteisiin, kuten avenantramideihin on suurta. Avenantramidien analysoinnissa on käytetty erilaisia uuttomenetelmiä ja useimmiten kvantitointi on perustunut suuren erotuskyvyn nestekromatografiaan (HPLC). Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografiaan (UHPLC) perustuva menetelmä yleisimpien avenantramidimuotojen 2c, 2f ja 2p tutkimiseen kaurasta ja kauratuotteista. Lisäksi tavoitteena oli tunnistaa myös muita avenantramidien muotoja, kuten 2f_d ja 2p_d, käyttäen nestekromatografi-massaspektrometritekniikkaa (UHPLC-QTOF-MS). Tutkimuksessa optimoitiin uuttomenetelmä ja validoitiin kvantitointiin käytetty UHPLC-PDA -menetelmä. Kehitetyllä menetelmällä tutkittiin avenantramidien pitoisuudet valikoiduista kauratuotteista.</p> <p>Työssä todettiin, että avenantramidien määrittämiin pitoisuuksiin ja pitoisuuksien vaihtelun suuruuteen vaikuttivat näytemäärän suuruus, näytteiden homogeenisyys ja uuttoaika. Kauraleseestä- ja jauhoista mitatut pitoisuudet olivat suurempia, kun näytemääränä oli 0,5 g eikä 0,1 g. Näytteen ja liuottimen suhde 1:10 toimi erinomaisesti ja uuttoliuottimena etanoli:vesi (80:20) osoittautui tehokkaammaksi kuin etanoli:vesi pH 2,8:ssa. Partikkelikoon pienentäminen ja yön yli uutto mahdollistivat avenantramidien paremman uuttuvuuden kuin lyhyt uutto ja suurempi partikkelikoko. UHPLC-menetelmä optimoitiin käyttäen hyväksi kromatografisia parametreja. Avenantramidit erottuivat hyväksyttävästi toisistaan ja eluoutuivat seuraavassa järjestyksessä 16 minuutin ajon aikana: 2c, 2p, 2f. Tulokset olivat toistettavia, UHPLC-laitteiston toistotarkkuus oli hyväksyttävä, ja vaste oli lineaarinen testatuilla pitoisuusalueilla kaikille kolmelle avenantramidille. Avenantramidien saannot olivat 99–117 %. UHPLC-QTOF-MS -menetelmällä kauranäytteistä tunnistettiin myös muita avenantramidimuotoja, kuten 2f_d, 2p_d, 5p, 5f ja 3f.</p> <p>Avenantramidien kokonaismäärä kauranäytteissä vaihteli välillä 3–41,3 µg/g tuorepainoa kohden. Kauraleseessä niitä oli eniten ja kaurajogurtissa vähiten. Kaurajauhoissa oli eniten muotoa 2c ja vähiten muotoa 2p. Kauraleseessä, -juomassa, -välipalassa, Nyhtökaurassa ja Murussa esiintyi 2f-muotoa enemmän kuin muita muotoja.</p> <p>Kehitetty UHPLC-menetelmä soveltuu jatkossa yleisimpien avenantramidimuotojen 2c, 2d, ja 2p määrittämiseen kaurasta ja kauratuotteista ja sitä voidaan hyödyntää jatkossa kauratutkimuksissa. Lisäksi menetelmällä voidaan tunnistaa ja kvantitoida laajemmin myös muita avenantramidimuotoja. Optimoitu uutto osoittautui toimivaksi ja toistettavaksi jo valmiiksi homogeenisille ja prosessoiduille näytteille, mutta epähomogeenisten näytteiden uuttoa voitaisiin jatkossa optimoida entisestään.</p>		
Avainsanat Avenantramidi, kaura, uutto, UHPLC, analyysimenetelmä		
Ohjaajat Minnamari Edelmann, Anna-Maija Lampi, Vieno Piironen		
Säilytyspaikka Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda		
Muita tietoja EKT-sarja 1914		

Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Degree Programme Master of Food Sciences	
Author Sharon Amanda Abderhalden			
Title The development and validation of an UHPLC-PDA -method for determination of oat avenanthramides			
Subject/Study track Food Chemistry			
Level Master's thesis	Month and year October 2019	Number of pages 62	
<p>Abstract</p> <p>Avenanthramides are hydroxycinnamic acids unique to oat (<i>Avena sativa</i> L., <i>Poaceae</i>). They consist of an anthranilic acid part (anthranilic acid or hydroxylated and/or methoxylated derivative of anthranilic acid) that is conjugated to a cinnamic acid part via an amide bond. More than 25 different avenanthramides are found and identified in oat. However, the most common forms are esters of 5-hydroxyanthranilic acid with caffeic (2c), ferulic (2f) and p-coumaric (2p) acids. Avenanthramides have been shown to possess antioxidant and anti-inflammatory properties.</p> <p>Currently there is a great interest towards oat and bioactive compounds of oat, like avenanthramides. In the previous studies there has been a lot of diversity concerning the extraction method used for analysis of avenanthramides and usually quantitation methods were based on high-performance liquid chromatography (HPLC). The aim of this research was to develop a method based on ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) for the analysis of the most common forms of avenanthramides (2c, 2f and 2p) in oat and oat products. In addition, also other forms of avenanthramides, like 2f_d and 2p_d, were identified and quantified using liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS). The extraction method of avenanthramides was optimized and the UHPLC-PDA method used for quantitation was validated. Finally, the study measured the differences in concentrations of avenanthramides in different oat products.</p> <p>In this study it was recognized that the concentrations and the extent of variation of the concentrations of avenanthramides were affected by the sample amount, the homogeneity of the samples and the extraction time used. Especially bigger sample amount of oat flour (0.5 g) led to larger and more reproducible results than smaller amount (0.1 g). The ratio of sample and solvent 1:10 worked excellently and as an extraction solvent ethanol:water (80:20) was more efficient than tested ethanol:water (80:20) with a phosphate buffer at pH 2.8. Smaller particle size of oat flour and extraction overnight led to better extractability of avenanthramides than a short extraction of sample with larger particle size. The UHPLC method was optimized using chromatographic parameters. The avenanthramides separated from each other acceptably and were eluted as follows during the 16-minute run: 2c, 2p, 2f. The response of the UHPLC instrument was linear in the tested concentration range for all three avenanthramides. The results were reproducible, and the accuracy of the UHPLC instrument was acceptable. The recovery % for avenanthramides were 99–117%. Also, other forms of avenanthramides, like 2f_d, 2p_d, 5p, 5f ja 3f, were identified in different oat samples using UHPLC-QTOF-MS technique.</p> <p>The total amount of avenanthramides in analyzed oat samples varied between 3–41.3 µg/g per fresh weight. Oat bran included them the most and oat snack the least. Avenanthramide 2c was dominant in oat flour which included 2p the least. In oat bran, in oat drink, in oat snack, in Nyhtökaura and in Muru the avenanthramide 2f was dominant over the two other forms.</p> <p>The UHPLC method developed in this study can be applied to the analysis of the most common forms of avenanthramides 2c, 2f and 2p in oat and in oat products and can be used in oat research in the future. The method can also be used to identify and quantitate more widely other forms of avenanthramides in different oat products. The optimized extraction was shown to be functional and reproducible to already homogeneous and processed samples, but the extraction of non-homogeneous samples could be optimized further in the future.</p>			
Keywords Avenanthramide, oat, extraction, UHPLC, analytical method			
Supervisors Minnamari Edelmann, Anna-Maija Lampi, Vieno Piironen			
Where deposited E-thesis collection of the University of Helsinki digital archives, Helda			
Additional information EKT Series 1914			

ESIPUHE

Tämän maisterintutkielman kokeellinen osuus suoritettiin Helsingin yliopiston elintarvike- ja ravitsemustieteiden osastolla kevään ja syksyn 2019 aikana. Tutkielman ohjaajana oli tutkijatohtori Minnamari Edelmann sekä avustavana ohjaajana oli yliopistonlehtori Anna-Maija Lampi. Tutkielman vastuuproffessorina oli Vieno Piironen. Sydämelliset kiitokset Minnamarille erityisen asiantuntevasta ohjaamistyöstä ja avusta kirjoitustyötä tehdessäni. Kiitokset myös Miikalle, joka avusti UHPLC- ja massaspektrometrilaitteiston käytössä. Erityiskiitoksen haluan osoittaa vanhemmilleni ja ystävilleni, jotka ovat tukeneet ja kannustaneet minua opintojeni aikana ja osoittaneet kiinnostusta tutkimustani kohtaan.

Vantaa, syyskuu 2019

Sharon Amanda Abderhalden

SISÄLLYSLUETTELO

ESIPUHE	4
SISÄLLYSLUETTELO.....	5
LYHENTEET	7
1. JOHDANTO	8
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	11
2.1 MATERIAALIT.....	11
2.1.1 NÄYTEMATERIAALIT	11
2.1.2 STANDARDIT, REAGENSsit JA LIUOTTIMET	12
2.1.3 LAITTEET JA LAITTEISTOT.....	13
2.2 KOEASETELMA	14
2.3 MENETELMÄT	14
2.3.1 STANDARDILIUOSTEN VALMISTUS	14
2.3.2 SISÄISEN STANDARDIN LIUKSEN VALMISTAMINEN	15
2.3.3 UUTTO	16
2.3.4 AVENANTRAMIDIEN TUNNISTUS, EROTUS JA KVANTITOINTI UHPLC- LAITTEISTOLLA	19
2.3.5 MENETELMÄN VALIDOINTI JA VALIDOINTIPARAMETRIT	21
2.3.6 AVENANTRAMIDIEN UHPLC-QTOF-MS -ANALYYSI.....	24
2.3.7 AVENANATRAMIDIEN TUTKIMINEN KAURATUOTTEISTA KEHITETYLLÄ MENETELMÄLLÄ	25
3. TULOKSET	26
3.1 UUTON OPTIMOINTI.....	26
3.1.1 UUTTOLIUOTIN	26
3.1.2 OPTIMOITU UUTTO.....	27
3.1.3 JAUHATUKSEN, NÄYTEMÄÄRÄN JA UUTTOAJAN VAIKUTUS AVENANTRAMIDIEN PITOISUUKSIIN	27
3.1.4 KAURAJAUHON UUTTOJÄÄNNÖSTEN ANALYYSI.....	29
3.2 UHPLC-ANALYYSI JA AJO-OLOSUHTEIDEN OPTIMOINTI	30
3.3 MENETELMÄN VALIDOINTI.....	32
3.4 KAURATUOTTEIDEN AVENANTRAMIDIPITOISUUDET	37
3.5 AVENANTRAMIDIEN 2 _{f_d} JA 2 _{p_d} ANALYYSI.....	38
3.5.1 UHPLC-QTOF-MS -ANALYYSI.....	38
3.5.2 AVENANTRAMIDIEN 2 _{f_d} JA 2 _{p_d} PITOISUUDET	40
4. POHDINTA	41
4.1 UUTON OPTIMOINTI.....	41

4.2 UHPLC-ANALYYSIN OPTIMOINTI	47
4.3 AVENANTRAMIDIEN MS-ANALYYSI.....	49
4.4 AVENANTRAMIDIT KAURATUOTTEISSA.....	50
5. PÄÄTELMÄT	54
6. LÄHDELUETTELO.....	56
LIITTEET	58
Liite 1. Kaurajauhon UHPLC-kromatogrammi	58
Liite 2. Kaurajogurtin UHPLC-kromatogrammi	59
Liite 3. Nyhtökauran UHPLC-kromatogrammi	60
Liite 4. Kaurajauhiksen UHPLC-kromatogrammi.....	61
Liite 5. Kauraleseen UHPLC-kromatogrammi	62

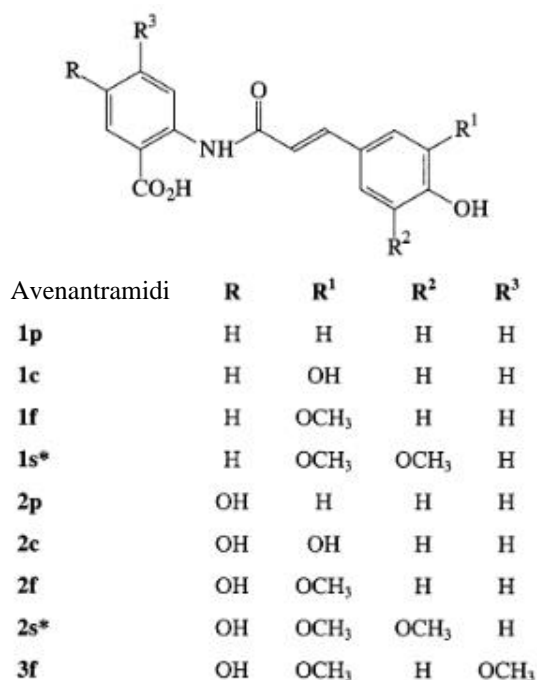
LYHENTEET

C18	oktadekyylisilaani (engl. octadecylsilane)
ESI	sähkösumutusionisaatio (engl. electrospray ionization)
FDA	Elintarvike- ja lääkevirasto (engl. Food and Drug Administration)
HPLC	suuren erotuskyvyn nestekromatografia (engl. high-performance liquid chromatography)
k	retentiotekijä (engl. retention factor)
LC	nestekromatografia (engl. liquid chromatography)
LOD	toteamisraja (engl. limit of detection)
LOQ	määrittäysraja (engl. limit of quantitation)
MS	massaspektrometria (engl. mass spectrometry)
N	pohjaluku (engl. plate count)
PDA	valodiodirividetektori (engl. photodiode array detector)
QTOF	kvadrupoli-lentoaikamassa-analysaattori (engl. quadrupole time-of-flight mass analyzer)
R _s	resoluutio (engl. resolution)
ss.	sisäinen standardi
t _R	retentioaika (engl. retention time)
UHPLC	erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia (engl. ultra-high-performance liquid chromatography)
UV	ultraviolettisäteily (engl. ultraviolet radiation)
2c	(N-(3, 4-Dihydroxycinnamoyl)-2-amino-5-hydroxybenzoic acid)
2p	((Z)-N-Coumaroyl-5-hydroxyanthranilic acid)
2f	((Z)-N-Feruloyl-5-hydroxyanthranilic acid)

1. JOHDANTO

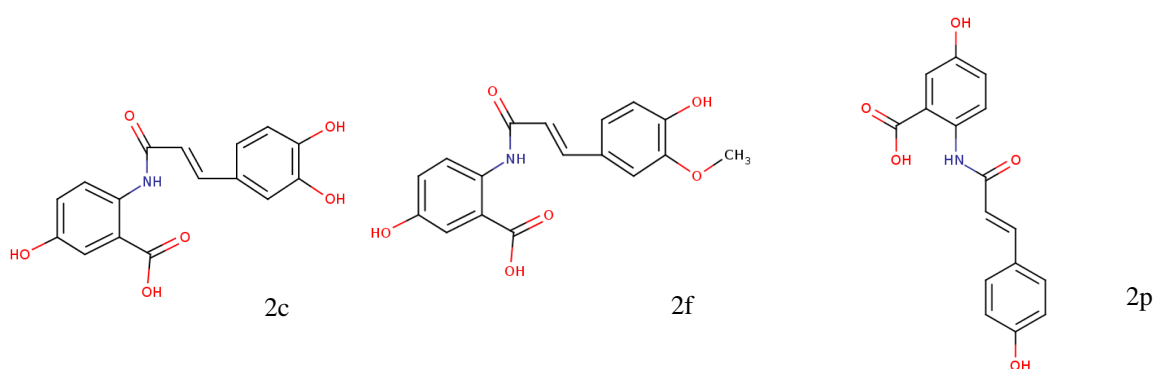
Suomi on yksi maailman suurimmista kauran tuottajamaista ja kauran kulutus kasvaa noin kymmenen prosentin vuosivauhdilla (Talouselämä 2019). Kaurasta onkin tullut trendivilja, jonka terveysvaikutuksista ollaan tällä hetkellä erityisen kiinnostuneita. Kaurasta löytyy, muista viljoista poiketen, avenantramideiksi kutsuttuja yhdisteitä, jotka ovat ainakin osittain vastuussa kauran ainutlaatuisista terveysvaikutuksista.

Avenantramidit ovat kaurassa (*Avena sativa* L., *Poaceae*) esiintyviä pienen molekyylipainon tyyppiä sisältäviä fenolisia alkaloideja (hydroksikaneliantraniilihappoja), joiden molekyyliarakenteessa on antraniilihappo tai hydroksyloitu ja/tai metoksyloitu antraniilihapon johdannainen konjugoituneena kanelihappoon (fenyylipropanoidi) amidisidoksella (Collins ym. 1989, Bratt ym. 2003, Jastrebova ym. 2006). Antraniilihappo voi olla viidessä eri muodossa: antraniilihappona (1), 5-hydroksiantraniilihappona (2), 5-hydroksi-4-metoksiantraniilihappona (3), 4-hydroksiantraniilihappona (4) tai 4,5-dihydroksiantraniilihappona (5) (Bratt ym. 2003, Jastrebova ym. 2006). Kanelihappo voi puolestaan olla kahvihappo (c), p-kumaarihappo (p) tai ferulahappo (f) (kuva 1).



Kuva 1. Avenantramidien rakenteet (Bratt ym. 2003).

Avenantramidit ovat kauran sekundaarisia metaboliitteja, jotka suojaavat kasvia muun muassa UV-säteilyltä ja patogeeneilta (Kaur ym. 2016). Avenantramideja on tunnistettu kaurasta yli 25 erilaista (Multari ym. 2018). Yleisimmät avenantramidit kaurassa ovat 5-hydroksiantraniilihapon ja p-kumaari-, kahvi- tai ferulahapon esterit 2c, 2f ja 2p (Mattila ym. 2005) (kuva 2). Avenantramidit 2f_d ja 2p_d ovat pitkäketjuisia avenalumiinihapon johdannaisia avenantramidimuodoista 2f ja 2p, niin sanottuja avenalumineja. Niillä on yksi ylimääräinen kaksoissidos. Avenantramidit ovat biologisesti käytettävissä ja niillä on todettu olevan antioksidatiivista ja anti-inflammatorista aktiivisuutta (Meydani ym. 2014). Siten avenantramidit vaikuttavat myös elintarvikkeiden oksidatiiviseen stabiilisuuteen ja ne ovat ainakin osittain vastuussa kauran terveysvaikutuksista (Meydani ym. 2014).



Kuva 2. Avenantramidien 2c, 2f ja 2p rakenteet (FooDB 2019).

Rakenteensa vuoksi avenantramidit ovat liukoisia orgaanisiin liuottimiin, kuten etyyliasetaattiin ja dietyylieetteriin, mutta suhteellisen liukenemattomia kloroformiin ja bentseeniin (Collins ym. 1989, Jastrebova ym. 2006). Niiden liukoisuus veteen riippuu suuresti pH:sta. Emäksisessä pH:ssa ne liukenevat jopa kylmään veteen. Avenantramidit kestävät happohydrolyysiä, mutta ne hydrolysoituvat hitaasti emäksisessä liuoksessa niistä koostuviksi kaneli- ja antraniilihapoiksi.

Avenantramidit sijaitsevat pääosin kauranjyvän aleuronikerroksessa leserikastetuissa jauhatusfraktioissa (Mattila ym. 2005). Avenantramidien pitoisuuksiin vaikuttavat muun muassa kauralajike (Chu ym. 2013), kasvuolosuhteet (Wise ym. 2014) ja prosessointi (Antonini ym. 2017). Avenantramidien pitoisuus kaurasta määritetään usein liuotinuutolla, jota seuraa nestekromatografia (LC, engl. liquid chromatography), joka yhdistetään useimmiten ultraviolettiaabsorptiodetektoriin (UV, engl. ultraviolet radiation) (Collins ym. 1988, Bryngelsson ym. 2002, Mattila ym. 2005) tai massaspektrometriseen (MS, engl. mass spectrometry) detektoriin (Jastrebova ym. 2006, Xie ym. 2017). Avenantramidien

erotuksessa käytetään nykyisin usein HPLC-laitetta (suuren erotuskyvyn nestekromatografia, engl. high performance liquid chromatography) ja C18-kolonnia (oktadekyylisilaani, engl. octadecylsilane) (Mattila ym. 2005, Bryngelsson ym. 2002, Multari ym. 2018). UHPLC (erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia, engl. ultra-high-performance liquid chromatography) ja kolonnit, joissa on pienempi partikkelikoko, lyhentävät lisäksi näytteen analyysiaikaa ja parantavat herkkyyttä (Xie ym. 2017).

Useissa tutkimuksissa avenantramidien uutossa on käytetty alkoholipohjaisia uuttoliuottimia (Jastrebova ym. 2006). Avenantramidien uuttoliuottimena on käytetty pääasiassa 80-prosenttista metanolia (Mattila ym. 2005, Kaur ym. 2016, Multari ym. 2018), 80-prosenttista etanolia vedessä (Jastrebova ym. 2006) tai fosfaattipuskurissa (Xie ym. 2017, Pridal ym. 2018).

Avenantramidien UHPLC-analyysissä käytetään gradienttia, jossa on kaksi liikkuvaa faasia. Tutkimuksissa toisena liikkuvana faasina (liuotin A) on käytetty useimmiten 0,1 % muurahaishappoa vedessä (Kaur ym. 2016, Pridal ym. 2018, Xie ym. 2017, De Bruijn ym. 2018) tai 0,05 M fosfaattipuskuria (pH 2,4) (Mattila ym. 2005, Multari ym. 2018). Toisena liikkuvana faasina (liuotin B) on käytetty 0,1 % muurahaishappoa metanolissa (Pridal ym. 2018, Xie ym. 2017, De Bruijn ym. 2018), metanolia (Mattila ym. 2005, Multari ym. 2018) tai asetonitriliä (Bratt ym. 2003, Kaur ym. 2016). Avenantramidit detektoidaan pääosin niiden UV-absorptiomaksimeissa 340 nm tai 350 nm.

Avenantramidien kvantitoinnissa käytetään usein ulkoista standardia, mutta myös sisäistä standardia voidaan käyttää (Xie ym. 2017). Ionisaatiotehokkuuden kontrolloimiseksi Xie ym. (2017) ottivat käyttöön sisäisen standardin, verapamilin. Pridal ym. (2018) käyttivät puolestaan sisäisenä standardina gallasetofenonia, mutta he totesivat myös 2-fenyyli-2,4,6-trihydroksiasetofenonin toimineen hyväksyttävästi.

Tutkitut kauramatriisit ovat olleet hyvin samankaltaisia eri tutkimuksissa. Pääasiassa tutkimuksia on tehty vain kaurajauhosta, -hiutaleista ja -leseistä (Bryngelsson ym. 2002, Mattila ym. 2005, Hitayezu ym. 2015). Pridal ym. (2018) ovat muista poiketen tarkastelleet laajemmin myös muita kauratuotteita. Mattila ym. (2005) ovat ainoana tutkineet avenantramideja suomalaisesta kaurasta, mutta vain melko suppeasti kaurahiutaleista ja -leseistä.

Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto tutkii tällä hetkellä paljonkin kauran kemiallisia ja teknologisia ominaisuuksia. Olisi tärkeää, että käytössä olisi toimiva menetelmä myös avenantramidien määrittämiseen. Julkaistun kirjallisuuden perusteella avenantramidien analysointiin on käytetty monia eri uutto- ja kvantitointimenetelmiä ja useimmiten menetelmät on kehitetty HPLC-laitteistolle eikä UHPLC-laitteistolle. Lisäksi avenantramideja on tähän mennessä määritetty pääasiassa vain täysjyväkaurajauhosta ja kaurahiutaleista eikä juurikaan prosessoiduista kauratuotteista.

Käyttöön otetulla menetelmällä voitaisiin tulevaisuudessa tutkia avenantramideja sekä itse kaurasta että prosessoiduista kauratuotteista. Tutkimusta tarvittiin nimenomaan avenantramidien pitoisuuksista suomalaisesta kaurasta valmistetuissa tuotteissa, koska avenantramidien pitoisuuksiin vaikuttavat suuresti muun muassa kauran genotyyppi, prosessointi, kauratuotteissa käytetyt jyvänosat ja kasvuolosuhteet, eivätkä muualla maailmassa tehtyjen tutkimusten tulokset ole siksi täysin verrattavissa suomalaiseen kauraan.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää ja validoida uutto- ja UHPLC-menetelmä avenantramidien yleisimpien muotojen 2c, 2f ja 2p määrittämiseksi kaurasta ja kauraa sisältävistä tuotteista. Lopuksi optimoidulla menetelmällä tutkittiin tiettyjen kauranäytteiden ja -tuotteiden avenantramipitoisuudet. Työn tavoitteena oli tutkia myös harvinaisempien avenantramidimuotojen esiintyvyyttä kauranäytteissä käyttäen tunnistukseen LC-MS -tekniikkaa (nestekromatografia-massaspektrometria, engl. liquid chromatography-mass spectrometry).

2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 MATERIAALIT

2.1.1 NÄYTEMATERIAALIT

Tässä tutkimuksessa kauratuotteiden avulla arvioitiin uuttomenetelmän ja kvantitointiin käytetyn UHPLC-menetelmän soveltuvuutta eri kauranäytteille. Avenantramidien uuttomenetelmän optimoinnissa käytettiin kuitenkin pääasiassa täysjyväkaurajauhoa ja kauralesettä. Lisäksi optimoidulla ja validoidulla menetelmällä analysoitiin avenantramideja täysjyväkaurajauhosta, kauraleseestä, kaurajuomasta, kaurajogurtista, nyhtökaurasta ja

Muru kaurajauhiksesta. Jokaista tuotetta hankittiin yksi yksittäispakkaus eri päivittäistavarakaupoista Helsingin alueelta. Taulukossa 1 on esitetty näiden tuotteiden kaurapitoisuudet, ominaisuudet, parasta ennen -päiväykset, merkit ja valmistajat. Kaikki tuotteet oli valmistettu suomalaisesta kaurasta. Tuotteiden kesken kaurapitoisuudet vaihtelivat välillä 8,5–100 %. Uuttomenetelmän tehokkuuden tutkimista varten kaurajauho ja kauralese jauhettiin 0,5 mm:n seulan läpi riittävän homogeenisyyden saavuttamiseksi. Nyhtökaura ja kaurajauhis jauhettiin homogeeniseksi Bamix-sauvasekoittajalla. Toteamis- ja määritysrajan määrittämisessä käytettiin täysjyväohrajuhoa (1 kg, p.e. 04.10.2019, Sunnuntai, Ravintoraisio Oy, Suomi).

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytettyjen kauratuotteiden kaurapitoisuudet, ominaisuudet, parasta ennen -päiväykset (p.e.), merkit, valmistajat ja valmistusmaat.

Tuote	Kaura (%)	Ominaisuudet	P.e.	Merkki/valmistaja/valmistusmaa
Täysjyväkaurajauho	100	gluteeniton, 950 g	05.02.2020	Myllärin, Helsingin Mylly Oy, Suomi
Kauralese	100	700 g	12.01.2020	Elovena, Ravintoraisio Oy, Suomi
Kaurajuoma	10	1 l	04.05.2019	Oatly
Kaurajogurtti	8,5	hapatettu, metsämarja, 400 g	03.06.2019	Yosa, Fazer, Suomi
Nyhtökaura	21	nude, vegaaninen, kypsä-papuproteiinivalmiste, 240 g	13.06.2019	Gold&Green Foods Oy, Järvenpää, Suomi
Muru kaurajauhis	41	225 g	01.08.2019	Ravintoraisio Oy, Suomi

2.1.2 STANDARDIT, REAGENSsit JA LIUOTTIMET

Kaupallisina standardeina käytettiin avenantramideja 2c (315,28 g/mol), 2f (329,30 g/mol) ja 2p (299,28 g/mol) (Sigma-Aldrich, Co/Chemie GmbH, Italia). 2-fenyyli-2,4,6-trihydroksiasetofenonia (244,24 g/mol, 97 %, Sigma-Aldrich chemistry, Sigma GmbH, Intia) käytettiin lisäksi sisäisenä standardina. Se valittiin sisäiseksi standardiksi siitä syystä, että se oli samantapainen yhdiste kuin tutkitut avenantramidit. Sen retentioaika oli sopiva, eikä se eluoitunut muiden yhdisteiden kanssa samanaikaisesti. Lisäksi Pridal ym. (2018) olivat todenneen sen toimivan hyväksyttävästi sisäisenä standardina. Uutossa ja UHPLC-analyysissä käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 2. Kaikki reagenssit olivat analyysilaatua, ja ajoliuoksissa käytetyt liuottimet olivat UHPLC-laatua.

Taulukko 2. Avenantramidien uutossa ja UHPLC-analyysissä käytetyt reagenssit ja liuottimet.

Reagenssi/liuotin	Puhtaus (%)	Merkki/valmistaja/valmistusmaa
MilliQ-vesi	-	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Etanoli AA (Etax)	99,5	Altia Oyj, Rajamäki, Suomi
Metanoli	≥99,9	LC-MS CHROMASOLV, Honeywell, Riedel-de Haen, Saksa
Fosfaattipuskuri (ammoniumdivetyfosfaatti)	-	Merck, KGaA, Darmstadt, Saksa
Fosforihappo	-	valmis liuos
Muurahaishappo	99	HiPerSolv CHROMANORM, VWR Chemicals, Lutterworth, Leicestershire, UK
Asetonitriili	≥ 99,9	CHROMASOLV, Honeywell, Riedel-de Haen, EU
Natriumkloridi	-	Merck KGaA, Darmstadt, Saksa
Vetykloridi (HCl)	-	12 M valmis liuos
Etyyliasettaatti	-	valmis liuos

2.1.3 LAITTEET JA LAITTEISTOT

Kaikki tutkimuksessa käytetyt laitteet ja laitteistot on esitetty taulukossa 3. UHPLC-analyyseissä käytettiin nestekromatografia (Acquity TM Waters, Milford, MA, USA), joka koostui näytekäsiköstä, automaattisesta näytteenottoajasta, binäärisestä liuotinyksiköstä, kolonnista ja UV-detektorista. Kolonniksi valittiin HSS T3 C18 -kolonni (Waters Acquity, UHPLC, Waters, Irlanti), jonka partikkelikoko oli 1,8 µm (2,1 x 150 mm). C18 (oktadekyyylisilaani, engl. octadecylsilane) viittaa kolonnin sisältämien partikkelien pinnan poolittomiin sidosryhmiin, joissa on 18 hiiliatomia sisältävät hiiliketjut.

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytetyt laitteet ja laitteistot.

Laite	Malli/merkki/valmistaja/valmistusmaa
Sonikaattori	Branson 5510, Branson Ultrasonics Corp., St. Louis, MO, USA
UHPLC-laitteisto	Acquity TM Waters, Milford, MA, USA PDA-detektori, Milford, MA, USA
Kolonni	Acquity UPLC Waters, Ireland
Tasoravistelija	Stuart, mini orbital shaker, SSM1, Cole-Parmer, Staffordshire, UK
Sentrifuugi	Eppendorf 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Saksa/Hermle Z 323, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Saksa
Typpihaidutin	Pierce model 18780, Rockford, IL, Yhdysvallat Reacti-Vap TM evaporating unit Reacti-Therm heating/stirring module
Vortex-sekoittaja	VWR International
pH-mittari	Meterlab PHM220, Radiometer Analytical, Lyon, Ranska
Mikrovaaka	Sartorius Cubis, Saksa
Analyysivaaka	Precisa XT 220A, Dietikon, Sveitsi
Bamix-sauvasekoitin	Bamix, Bamix ESGE Ltd., Sveitsi
Massaspektrometri	Waters Synapt G2-Si, Milford, MA, USA
Jauhatuslaite	Retsch ZM 200, Retsch GmbH, Haan, Saksa

2.2 KOEASETELMA

Tutkimuksessa optimoitiin uuttomenetelmä kaurajauholla, validoitiin UHPLC-PDA -menetelmä (valodiodirividetektor, engl. photodiode array detector) sekä analysoitiin avenantramideja erilaisista kauratuotteista. Kauratuotteiden avulla siis arvioitiin uuttomenetelmän ja kvantitointiin käytetyn UHPLC-menetelmän soveltuvuutta eri kauranäytteille ja lisäksi tutkittiin kauratuotteiden avenantramidien pitoisuuksia ja pitoisuuksien vaihtelua.

Uuttomenetelmän optimointiin sisältyivät uuttoliuottimen valinnan lisäksi uuttoliuottimen määrän, näytemäärän ja uuttokertojen optimointi. UHPLC-analyysin kehityksessä keskityttiin ajoliuoksiin, virtausnopeuteen, kolonnin lämpötilaan, gradienttiin ja ajoaikoihin. UHPLC-menetelmän validoinnissa määritettiin menetelmää arvioivia parametreja, kuten lineaarisuutta, toistettavuutta ja tarkkuutta. Menetelmän kehitystä seurasi sovellusosa, jossa kauratuotteista määritettiin avenantramideja. Menetelmällä identifioitiin ja kvantitoitiin kaurassa runsaimmin esiintyviä avenantramideja. Nämä tulokset varmistettiin vielä massaspektrometrillä. MS-analyysiä käytettiin lisäksi muiden avenantramidien tunnistamiseen.

2.3 MENETELMÄT

2.3.1 STANDARDILIUOSTEN VALMISTUS

Avenantramidistandardeista valmistettiin kantaliuokset ja niiden laimennokset menetelmän käyttöönottoa ja testausta varten. Liuokset valmistettiin ja uutto suoritettiin valolta suojatussa tilassa. Näitä kantaliuoksia käytettiin myöhemmin myös standardisuorien valmistamiseen, lineaarisuuden mittaukseen, saantojen laskemiseen ja toteamisrajan määrittämiseen. Standardeista valmistettiin metanoliin kantaliuokset, joiden pitoisuudet olivat 0,1 mg/ml. Liuoksia sonikoitiin muutaman minuutin ajan, minkä jälkeen liuokset siirrettiin näyteputkiin. Liuoksia varastoitettiin koko tutkimuksen ajan pakastimessa (-18 °C) säilyvyyden varmistamiseksi. UHPLC-analyysijä varten kantaliuoksia laimennettiin metanoliin siten, että saatiin pitoisuudeksi 0,01 mg/ml (taulukko 4).

Avenantramidistandardien kantaliuoksista valmistettiin metanoliin lisäksi ns. standardiseos, jossa kunkin avenantramidin pitoisuus oli 0,01 mg/ml (taulukko 4). Liuokset suodatettiin 0,2

µm:n suodattimien (13 mm, Acrodisc GHP, Pall Corporation, Ann Arbor, MI, Yhdysvallat) läpi UHPLC-näytepulloihin (Waters Corp., Milford, MA, Yhdysvallat) UHPLC-analyysiä varten.

Taulukko 4. Avenantramidistandardien kantaliuosten, niiden laimennosten ja avenantramidistandardiseoksen koostumukset (avenantramidistandardien ja metanolin määrät), kokonaistilavuudet (ml) ja avenantramidistandardien pitoisuudet (mg/ml).

Näyte	Standardin määrä	Metanolin määrä	Kokonaistilavuus (ml)	Pitoisuus (mg/ml)
Kantaliuos	1 mg	10 ml	10	0,1
Kantaliuoksen laimennos	100 µl	900 µl	1	0,01
Standardiseos	200 µl	1400 µl	2	0,01

2.3.2 SISÄISEN STANDARDIN LIUKSEN VALMISTAMINEN

Sisäisenä standardina käytetystä 2-fenyyl-2,4,6-trihydroksiasetofenonista valmistettiin kantaliuos ja sen laimennos menetelmän käyttöönottoa ja testausta varten. Sisäisen standardin liuoksen laimennosta käytettiin myöhemmin kvantitoitaessa avenantramideja näytteistä. Sisäisen standardin kantaliuoksen valmistamista varten 10 mg sisäistä standardia punnittiin ja se liuotettiin 10 ml:aan metanolia, jolloin kantaliuoksen pitoisuus oli 1 mg/ml. Liuos siirrettiin näyteputkiin. Sisäisen standardin liuosta laimennettiin metanoliin UHPLC-analyysiä varten siten, että laimennoksen pitoisuus oli 0,1 mg/ml. Lisäksi avenantramidistandardien ja sisäisen standardin kantaliuoksista valmistettiin ns. standardiseos, jossa avenantramidistandardien pitoisuudet olivat 0,01 mg/ml ja sisäisen standardin pitoisuus oli 0,1 mg/ml. Liuokset suodatettiin UHPLC-näytepulloihin analyysiä varten. Sisäisen standardin liuokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Sisäisen standardin kantaliuoksen, sen laimennoksen ja standardiseoksen (avenantramidistandardien ja sisäisen standardin kantaliuoksista) koostumukset (avenantramidistandardien, sisäisen standardin ja metanolin määrät), kokonaistilavuudet (ml) ja sisäisen standardin pitoisuudet (mg/ml).

Näyte	Standardin määrä	Metanolin määrä	Kokonaistilavuus (ml)	Pitoisuus (mg/ml)
Kantaliuos	10 mg	10 ml	10	1
Kantaliuoksen laimennos	100 µl	900 µl	1	0,1
Standardiseos + ss.¹	200 µl	1200 µl	2	0,1

¹ss. = sisäinen standardi

2.3.3 UUTTO

Uuttomenetelmän valintaa edelsi laaja kirjallisuuskatsaus. Uuttoa kehitettiin kuitenkin pääasiassa mukaillen Pridalin ym. (2018) kehittämää menetelmää ja elintarvike- ja ravitsemustieteiden osastolla jo käytössä ollutta fenolisten yhdisteiden uuttomenetelmää. Uuton peruskulku oli seuraava: uuttoliottimen lisäys, sonikointi, sekoitus tasoravistelijassa, sentrifugointi, supernatantin talteenotto (edellä mainittu kolme kertaa), supernatanttien haihdutus tyypellä, liuotus metanoliin ja suodatus näytepulloihin. Avenantramideja uutettiin kaurajauhosta, kauraleseestä, kaurajuomasta, kaurajogurtista, nyhtökaurasta ja kaurajauhiksesta. Uutossa verrattiin, käyttäen kaurajauhoa tai kauralesettä testaukseen, näytteen määrää ja jauhatustasetta, uuttoliuotinta, liuottimen määrää ja uuttoaikaa.

Uuttoliuottimen vaikutus

Tutkimuksessa verrattiin kahta erilaista uuttoliuotinta. Testattaviksi uuttoliuottimiksi valittiin 80-prosenttinen etanoli (80:20, etanoli:vesi) ja 80-prosenttinen etanoli, johon lisättiin fosfaattipuskuria (ammoniumdivetyfosfaatti) ja fosforihappoa, niin että saavutettiin pH-arvoksi 2,8. Lisättyä fosforihappoa (1,5 M, H_3PO_4) laimennettiin ensin 1:10 (1 ml fosforihappoa ja 9 ml vettä). Uuttoliuotin valmistettiin lisäämällä 10 ml MilliQ-vettä 80 ml:aan etanolia. Liuoksen pH-arvo säädettiin arvoon 2,8 ja liuoksen kokonaistilavuudeksi saatiin 200 ml. Kaurajuoma ja kaurajogurtti uutettiin alusta lähtien pelkällä etanolilla, koska ne sisälsivät runsaasti vettä.

Uuttoliuottimen määrä

Uuttoliuottimen määränä kokeiltiin aluksi $2+1+1 \text{ ml} = 4 \text{ ml}$. Uuttoliuottimen kertamääräksi optimoitiin kuitenkin 1 ml, eli supernatantteja kerättiin kolme kertaa toistettavasta uutosta yhteensä 3 ml. Uutettaessa kaurajauhoa viisi kertaa enemmän (0,5 g vs. 0,1 g) myös uuttoliuottimen määrää suurennettiin samassa suhteessa 5 ml:aan. Myös 0,5 g:n näytteitä uutettiin kolme kertaa, eli uuttoliuotinta käytettiin silloin yhteensä 15 ml.

Näytteen määrä

Kauratuotteiden uuttomäärät valittiin niiden kaurapitoisuuden perusteella: kaurajauho (0,1 g)>kauralese (0,1 g)>kaurajauhis (0,2 g)>nyhtökaura (0,2 g)>kaurajuoma (0,5 g)>kaurajogurtti (0,5 g). Mitä vähemmän tuote sisälsi kauraa ja mitä enemmän muita raaka-aineita tuote sisälsi, sitä enemmän tuotetta punnittiin. Kaurajauhoa uutettiin aluksi siis vain 0,1 g. Tutkimuksen edetessä testattiin kuitenkin myös suurempaa näytemäärää (0,5 g).

Rinnakkaisnäytteet

Yleisimpiä avenantramidimuotoja 2c, 2f ja 2p tutkittiin eri kauratuotteiden rinnakkaisnäytteistä. Tutkittaessa menetelmän toistettavuutta kaurajauhosta ja -jogurtista valmistettiin molemmista 12 rinnakkaisnäytettä. Jauhatusasteen, näytemäärän ja uuttoajan analysoimista varten kaurajauhonäytteet valmistettiin neljänä rinnakkaisena. Avenantramideja tutkittiin lisäksi kolmesta rinnakkaisesta jauhonäytteen uuttojäännöksestä. Tutkittaessa muita kauratuotteita rinnakkaisnäytteiden määrä vaihteli. Kauralesenäytteitä valmistettiin kuusi rinnakkaista ja kaurajuomanäytteitä kolme rinnakkaista. Avenantramideja tutkittiin puolestaan neljästä rinnakkaisesta nyhtökaura- ja kaurajauhisnäytteestä. Tutkittaessa 2f_d- ja 2p_d-muotojen pitoisuuksia kaurajauhosta ja kaurajauhiksesta niistä molemmista valmistettiin kolme rinnakkaisnäytettä.

Uuton yleinen kulku

Kaurajauhon uutto toistettiin kolme kertaa ja näytteet valmistettiin neljänä rinnakkaisena. Eppendorf-putkiin (Eppendorf AG, Hamburg, Saksa) punnittiin 0,1 g kaurajauhoa. Sisäisen standardin kantaliuoksen laimennosta (1:50) lisättiin 75 µl (1,5 µg), minkä jälkeen uuttoliuotinta lisättiin 1 ml. Liuoksia sonikoitiin 10 minuutin ajan ja niitä sekoitettiin tasoravistelijassa 20 minuuttia (200 rpm). Liuoksia sentrifugoitiin lopuksi 5 minuutin ajan (3000 rpm, 20 °C), minkä jälkeen supernatantit kerättiin. Valmiit uutteen haihdutettiin kuiviksi tyypellä 40 °C:ssa (noin 3 h). Haihdutuksen nopeuttamiseksi liuoksiin lisättiin pieniä määriä etanolia. Kuiva-aine liuotettiin 200 µl:aan metanolia, liuos sekoitettiin Vortex-sekoittajalla ja suodatettiin (0,2 µm suodattimen läpi) näytepulloihin.

Uuttoajan vaikutus

Kaurajauholla toteutettu uuttoprosessi oli samanlainen myös muille kauratuotteille. Ainut poikkeus oli tutkittaessa yön yli uuton vaikutusta tuloksiin. Tällöin kaurajauhoja (0,1 g ja 0,5 g) ravisteltiin tasoravistelijassa yön yli (15 h) ensimmäisen uuton aikana. Seuraavat kaksi sekoitusta kestivät 20 minuuttia, kuten normaalin uuton aikana. Uuttoajan pidentämisellä pyrittiin lisäämään avenantramidien uuttuvuutta ja suurentamaan siten avenantramidien määritettyjä pitoisuuksia.

Jauhatusasteen vaikutus

Tutkimuksen edetessä tutkittiin lisäksi jauhatusasteen vaikutusta avenantramidien uuttuvuuteen ja siten myös niiden pitoisuuksiin. Tätä varten kaurajauho jauhettiin 0,5 mm seulan läpi (Retsch ZM 200, Retsch GmbH, Haan, Saksa).

Uuton vaikutus sisäiseen standardiin

2-fenyyli-2,4,6-trihydroksiasetofenonin toimivuutta testattiin sisäisenä standardina kauratuotteiden uutossa. Uutto suoritettiin samalla tavalla kuin ilman sisäistä standardia. Uuttoliuottimina kokeiltiin molempia uuttotesteissä käytettyjä liuottimia: 80-prosenttista etanolia ja 80-prosenttista etanolia fosfaattipuskurin kanssa. Sisäisen standardin kantaliuosta (1 mg/ml) lisättiin uuton alussa 50 µl (50 µg), mutta UHPLC-analyysi todisti sisäisen standardin pitoisuuden olevan liian suuri liuoksessa. Tästä syystä sisäisen standardin kantaliuosta laimennettiin 1:50 metanoliin (0,02 mg/ml). Tätä liuosta lisättiin kaurajauhon uutossa 75 µl (1,5 µg). Sisäisen standardin pitoisuudet olivat tällöin lähempänä kauratuotteiden tutkittavien avenantramidien pitoisuuksia. Uutettaessa suurempi määrä (0,5 g) kaurajauhoa sisäisen standardin liuoksen määrää suurennettiin 300 µl:aan (6 µg). Taulukossa 6 on esitetty kauranäytteille valitut uuttoliuottimet ja näytteisiin lisätyn sisäisen standardin määrät (µg).

Taulukko 6. Kauratuotteiden uuttoa varten punnitut massat (g), uutossa käytetyt uuttoliuottimet ja lisätty sisäisen standardin määrä (µg).

Näyte	Massa (g)	Uuttoliuotin	Sisäisen standardin määrä (µg)
Kaurajauho (suurempi partikkelikoko, N=3)	0,1	80-prosenttinen etanoli	50
Kaurajauho (suurempi partikkelikoko, N=3)	0,1	80-prosenttinen etanoli + fosfaattipuskuri	50
Kaurajauho (suurempi partikkelikoko, N=12)	0,1	80-prosenttinen etanoli	1,5
Kaurajauho (0,5 mm, N=4)	0,1	80-prosenttinen etanoli	1,5
Kaurajauho (0,5 mm, N=4)	0,5	80-prosenttinen etanoli	6
Kauralese (N=6)	0,1	80-prosenttinen etanoli	1,5
Kaurajuoma (N=3)	0,5	Etanoli	1,5
Kaurajogurtti (N=12)	0,5	Etanoli	1,5
Nyhtökaura (N=4)	0,2	80-prosenttinen etanoli	1,5
Kaurajauhis (N=4)	0,2	80-prosenttinen etanoli	1,5

Kaurajauhon uuttojäännösten analyysi

Uuton tehokkuuden tutkimiseksi kaurajauhon eri lailla toteutettujen uuttojen uuttojäännökset analysoitiin uudelleen. Uuttojäännökset uutettiin edellä mainitun uuttoprosessin mukaisesti, mutta ilman sisäisen standardin lisäystä. Tulosten käsittelyssä käytettiin ulkoisen standardin menetelmää, koska sisäistä standardia ei ollut enää uuttojäännöksissä jäljellä.

2.3.4 AVENANTRAMIDIEN TUNNISTUS, EROTUS JA KVANTITOINTI UHPLC-LAITTEISTOLLA

Yleistä

Tutkimuksessa keskityttiin pääasiassa avenantramidien runsaimmin esiintyviin 2c-, 2f- ja 2p-muotoihin, jotka tunnistettiin, erotettiin ja kvantitoitiin UHPLC-laitteistolla. Tutkimuksessa käytettiin gradienttiajoa, eli eluentin koostumus muuttui kromatografisen ajon aikana vaihteittain. Avenantramidit tunnistettiin vertaamalla niiden retentioaikoja ja UV-spektrejä standardiyhdisteiden retentioaikoihin ja UV-spektreihin. Tulokset analysoitiin UHPLC-laitteen Waters Empower 2 -ohjelmalla ja näytteiden tulokset laskettiin MS Office Excel -ohjelmalla.

UHPLC-analyysin optimointi

UHPLC-analyysin optimointi edellytti gradientin optimointia standardiseoksella. Siihen sisältyivät ajoaikojen optimointi, ajoliuosten prosentuaalisen suhteen optimointi ja ajoliuoksen valinta. Gradientti optimoitiin tarkastelemalla kromatogrammien profiileja ja kromatografisia parametreja, jotka laskettiin System suitability -ohjelman avulla.

Erotuksen tehokkuutta kromatografiassa kuvaavat piikin resoluutio (R_s , engl. resolution), pohjaluku (N , engl. plate count) ja retentiotekijä (k , engl. retention factor) (Riekkola ja Hyötyläinen 2002). Kun R_s on 1,5, piikit ovat erottuneet toisistaan ja piikkien välinen kohta sivuaa pohjaviivaa. Pohjaluvun ja retentiotekijän suurentaminen parantaa resoluutiota. Pohjaluku on kolonnin erotuskykyä kuvaava luku. Retentioaika (t_R , engl. retention time) on puolestaan aika injektio kohdan ja piikin maksimikohdan välillä, eli aika, joka tutkittavalta yhdisteeltä kuluu, kun se kulkeutuu injektorilta detektorille. Retentiotekijä kuvaa aikaa, jonka näytteen yhdiste pysyy stationaarifaasissa suhteessa siihen aikaan, jonka yhdiste on liikkuvassa faasissa.

Kromatografisia parametreja ovat myös piikin pinta-ala (A) ja piikkien symmetriaa kuvaava häntimistekijä (engl. USP-tailing). FDA:n (Elintarvike- ja lääkevirasto, engl. Food and Drug Administration) kromatografiamenetelmän validointiohjeiden mukaiset validointiparametrien hyväksyttävät arvot on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. FDA:n kromatografiamenetelmän validointiohjeiden mukaiset validointiparametrien hyväksyttävät arvot (FDA 1994).

Validointiparametri	Hyväksyttävä arvo
Retentiotekijä (kapasiteetti)	$k \geq 2$
Resoluutio (erottuvuus)	$R_s > 2$
Häntimistekijä (symmetria)	$T \leq 2$
Pohjaluku (tehokkuus)	$N > 2000$

Avenantramidit koostuvat karboksyylihapoista, joten happamia liikkuvia faaseja käytetään usein vaimentamaan karboksyyliyhdyntien ionisoituminen ja saamaan aikaan hyvä erottuminen (Jastrebova ym. 2006). Ajoliuoksina kokeiltiin eri vaihtoehtoja. A liuottimena testattiin MilliQ-vettä, johon lisättiin 0,1 % (pH 2,77) tai 0,5 % muurahaishappoa (pH 2,46). B liuottimen vaihtoehdot olivat 0,1 % muurahaishappoa asetonitrilissä, 0,1 % muurahaishappoa metanolissa tai 0,5 % muurahaishappoa asetonitrilissä. Virtausnopeus oli 0,3 millilitraa/minuutissa, kolonnin lämpötila 40 °C ja injektio tilavuus 5 µl.

Kun nestekromatografiset parametrit oli optimoitu, menetelmä validoitiin. Validoinnilla varmistettiin, että menetelmä sopii käyttötarkoitukseen. Kromatografisen menetelmän toimintakykyä arvioitiin määrittämällä validointiparametrit, kuten lineaarisuus, havaitsemisraja ja määrittämisraja, toistettavuus, saanto ja UHPLC-laitteiston toistotarkkuus.

2.3.5 MENETELMÄN VALIDOINTI JA VALIDOINTIPARAMETRIT

Lineaarisuus

UHPLC-menetelmän lineaarisuutta tutkittiin tarkastelemalla sitä, miten vasteet muuttuivat pitoisuuksien muuttuessa. Lineaarisuudella tarkoitetaan analyttisen menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio vasteen ja näytteiden tutkittavan aineen pitoisuuden välillä (Saari 2010). Selityskerroin (R^2) eli korrelaatiokertoimen neliö kuvaa tilastollisesti sitä, miten suuri osa muuttujan Y varianssista selittyy lineaarisella riippuvuudella (Häsä 2015).

Lineaarisuutta tutkittiin määrittämällä kunkin avenantramidimuodon vaste yhdeksälle eri pitoisuudelle pitoisuusalueella 0,1–5 ng/μl. Avenantramidistandardien kantaliuoksista (0,1 mg/ml) tehtiin laimennokset 1:5 (0,02 mg/ml). Sisäisen standardin vahvasta liuoksesta (1 mg/ml) tehtiin puolestaan laimennos 1:10 (0,1 mg/ml). Taulukossa 8 on esitetty standardisuoran määrittämistä varten valmistettujen kantaliuosten ja niiden laimennosten koostumukset, kokonaistilavuudet ja pitoisuudet.

Taulukko 8. Standardisuoran määrittämistä varten valmistettujen avenantramidistandardien kantaliuosten, sisäisen standardin kantaliuoksen ja näistä kantaliuoksista muodostettujen laimennosten koostumukset (avenantramidistandardien, sisäisen standardin ja metanolin määrät), kokonaistilavuudet (ml) ja avenantramidistandardien ja sisäisen standardin pitoisuudet (mg/ml).

Näyte	Standardin määrä	Ss:n ¹ määrä (mg)	Metanolin määrä (ml)	Kokonaistilavuus (ml)	Pitoisuus (mg/ml)
Kantaliuos avenantramidi	1 mg	-	10	10	0,1
Kantaliuos ss.¹	-	10	10	10	1
Laimennos avenantramidi (1:5)	1 ml	-	4	5	0,02
Laimennos ss.¹ (1:10)	1 ml	-	9	10	0,1

¹ss. = sisäinen standardi

Standardiliuoksia pipetoitiin standardisuoran pisteitä varten 5, 12,5, 25, 50, 125 ja 250 µl. Lisäksi 5 µl:n liuoksesta saatiin vielä kolme pistettä, kun injektioilavuutta pienennettiin 5 µl:sta 3, 2 ja 1 µl:aan. Sisäisen standardin kantaliuoksen 1:10 laimennosta lisättiin kaikkiin liuoksiin 50 µl. Liuoksiin lisättiin metanolia niin, että kokonaistilavuudeksi saatiin 1 ml. Pitoisuuksiltaan erilaiset standardiliuokset valmistettiin ja mitattiin kolmena eri päivänä kolmena rinnakkaisinjektiona. (taulukko 9).

Taulukko 9. Standardisuoran määrittämistä varten valmistettujen liuosten koostumukset (avenantramidistandardien, sisäisen standardin ja metanolin määrät, µl), kokonaistilavuudet (ml) ja avenantramidistandardien ja sisäisen standardin pitoisuudet (ng/µl).

Näyte	Standardin määrä (µl, 1:5)	Standardin pitoisuus (ng/µl)	Ss:n ¹ määrä (µl, 1:10)	Ss. ¹ pitoisuus (ng/µl)	Metanolin määrä (µl)	Kokonaistilavuus (ml)
1	5 (x 3)	0,1	50	5	935	1
2	12,5 (x 3)	0,25	50	5	912,5	1
3	25 (x 3)	0,5	50	5	875	1
4	50 (x 3)	1	50	5	800	1
5	125 (x 3)	2,5	50	5	575	1
6	250 (x 3)	5	50	5	200	1

¹ss. = sisäinen standardi

Toistettavuus

Toistettavuus on peräkkäisten mittaustulosten paikkansapitävyyttä, joka määritetään tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä. Menetelmän toistettavuutta testattiin tekemällä rinnakkaismäärittäyksiä kaurajauholla (N=12) ja kaurajogurtilla (N=12). Kaurajauhon ja kaurajogurtin rinnakkaisnäytteet (N=4) analysoitiin kolmena eri päivänä. Mittausolosuhteet pysyivät samanlaisina määrittysten ajan.

UHPLC-laitteiston toistotarkkuus näytettä analysoitaessa

Toistotarkkuudella tarkoitetaan laitteen kykyä saada toistettavia tuloksia. Se mittaa laitteen satunnaisvirhettä ja se ilmoitetaan keskihajontana. Laitteen toistotarkkuutta tarkkailtiin injektioimalla kolmea rinnakkaista kauralesenäytettä (0,1 g) neljä kertaa peräkkäin.

Saanto

Saanto on tutkittavan yhdisteen suhteellinen osuus, joka saadaan määrittetyksi näytteestä (Saari 2010). Se mittaa tulosten oikeellisuutta. Kaurajauhon saantokoetta varten

kaurajauhonäytteisiin lisättiin avenantramidistandardeja ja sisäistä standardia uuton yhteydessä. Tätä varten avenantramidistandardien kantaliuoksista ja sisäisen standardin kantaliuoksesta valmistettiin laimennokset. Kaurajauhojen saantoja tarkasteltiin kahdella eri näytemäärällä (0,1 g ja suurempi partikkelikoko vs. 0,5 g ja jauhettu partikkelikokoon 0,5 mm) ja kahdella/kolmella standardien lisäystasolla. Kun näytemääränä oli 0,1 g, standardeja lisättiin näytteeseen kolmella eri lisäystasolla, 0,25 µg, 0,5 µg ja 2 µg, ja sisäistä standardia lisättiin 1,5 µg. Kun näytemäärä suurennettiin 0,5 g:aan, myös standardien (2,5 µg ja 10 µg, kaksi eri lisäystasoa) ja sisäisen standardin määrä (6 µg) suureni samassa suhteessa (taulukko 10). Näytteet valmistettiin neljänä rinnakkaisena.

Taulukko 10. Avenantramidistandardien kantaliuosten ja sisäisen standardin kantaliuoksen pitoisuudet (µg/µl) sekä niistä saantokoetta varten valmistettujen laimennosten pitoisuudet (µg/µl), näytteeseen lisättävien laimennosten määrät (µl) ja avenantramidistandardien ja sisäisen standardin määrät näytteessä (µg).

Kantaliuos	Pitoisuus (µg/µl)	Pitoisuus (µg/µl) (laimennos)	Lisättävä määrä (µl)	Määrä näytteessä (µg)
2p	0,1	0,01 (1:10)	25/50/200 tai 250/1000	0,25/0,5/2 tai 2,5/10
2f	0,1	0,01 (1:10)	25/50/200 tai 250/1000	0,25/0,5/2 tai 2,5/10
2c	0,1	0,01 (1:10)	25/50/200 tai 250/1000	0,25/0,5/2 tai 2,5/10
ss. ¹	1	0,02 (1:50)	75/300	1,5/6

¹ss. = sisäinen standardi

Saantoprosentti laskettiin kaavalla 1:

$$\text{saantoprosentti} = \frac{\text{todellinen saanto}}{\text{teoreettinen saanto}} \times 100 \% \quad (1)$$

missä todellinen saanto oli avenantramidien mitattu pitoisuus ja teoreettinen saanto oli avenantramidistandardien lisäyksien avulla laskettu avenantramidien pitoisuus.

Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisraja (LOD, limit of detection) on pienin analyysimenetelmällä havaittava pitoisuus, joka voidaan todeta luotettavasti tutkittavalle yhdisteelle (Saari 2010). Toteamisrajan määrittämistä varten näytettä (ohrajauho, joka ei sisällä avenantramideja) uutettiin sama määrä kuin kaurajauhoa (0,1 g) ja ohranäytteisiin lisättiin avenantramidistandardeja (noin 0,1 µg) ja sisäistä standardia (noin 1,5 µg) uuton yhteydessä. Tätä varten avenantramidistandardien

kantaliuoksista ja sisäisen standardin kantaliuoksesta valmistettiin laimennokset 1:50 (taulukko 11). Näytteet tehtiin neljänä rinnakkaisena. Valmiista uutteesta (200 µl) tehtiin vielä laimennos 1:10 (100 µl uutetta ja 900 µl metanolia). Toteamisraja määritettiin injektoimalla eri tilavuuksia liuosta (5/4/3/2/1/0,5 µl). Toteamisraja voidaan laskea myös kaavalla 2:

$$\text{LOD} = 3 \times S/N \quad (2)$$

missä S = signaali, vaste ja N = kohina, noise, tausta.

Taulukko 11. Avenantramidistandardien kantaliuosten ja sisäisen standardin kantaliuoksen pitoisuudet (µg/µl) sekä niistä toteamisrajan määrittämistä varten valmistettujen laimennosten pitoisuudet (µg/µl), näytteeseen lisättävien laimennosten määrät (µl) ja avenantramidistandardien ja sisäisen standardin määrät näytteessä (µg).

Kantaliuos	Pitoisuus (µg/µl)	Pitoisuus (µg/µl) (laimennos 1:50)	Lisättävä määrä (µl)	Määrä näytteessä (µg)
2p	0,1	0,002	50	0,1
2f	0,1	0,002	50	0,1
2c	0,1	0,002	50	0,1
ss. ¹	1	0,02	75	1,5

¹ss. = sisäinen standardi

Määrittämisraja (LOQ, limit of quantitation) on pienin analysoitavan yhdisteen pitoisuus, joka voidaan määrittää luotettavalla tarkkuudella ja täsmällisyydellä (Saari 2010). Yleensä laskennallinen arvo toteamisrajasta on 2–5 x LOD. Tutkimuksessa käytettiin kaavaa 3:

$$\text{LOQ} = 3 \times \text{LOD} \quad (3)$$

missä LOD = määrittämisraja.

2.3.6 AVENANTRAMIDIEN UHPLC-QTOF-MS -ANALYYSI

Kauratuotteiden (jauho, lese, jogurtti, nyhtökaura ja kaurajauhis) muiden avenantramidimuotojen, kuten 2f_d, 2p_d, 5p, 5f ja 3f, tunnistamisessa käytettiin massaspektrometriaa (liite 5). 2f_d- ja 2p_d-muodot valittiin tarkasteluun, koska niistä oltiin erityisen kiinnostuneita ja niitä oli tutkittu aikaisemmin. UHPLC-MS -analyysin avulla varmennettiin lisäksi 2c-, 2f- ja 2p-muodot kauratuotteista.

Avenantramidien analysoinnissa käytettiin massaspektrometria (Waters Synapt G2-Si, Milford, MA, USA), joka sisälsi ES-ionilähteen, Waters UHPLC -kaksoispumpun,

näytteensyöttäjän, kolonniuunin, UV-detektorin (320 nm) ja Mass Lynx -ohjelmiston. UHPLC-laitteessa oli HSS T3 C18 -kolonni (Waters Acquity, UHPLC, Waters, Irlanti), jonka partikkelikoko oli 1,8 µm (2,1 x 150 mm). Uunin lämpötila oli 40 °C. Näytteitä injektioitiin 1–5 µl, mutta 1 µl todettiin riittäväksi injektioilavuudeksi. Yhdisteet ionisoitiin sähkösumutusionisaatiolla (ESI, engl. electrospray ionization). Massa-analysaattorina oli kvadrupoli-lentoaikamassa-analysaattori (QTOF, engl. quadrupole time-of-flight mass analyzer). Liikkuvana faasina käytettiin UHPLC-PDA -menetelmässä käytettyjä ajoliuoksia.

Massaspektrometrin parametrit on esitetty taulukossa 12. Muodostuneet ionit mitattiin massavarausalueella 50–1200 m/z. Molekyyli-ionien ja fragmentti-ionien massavaraussuhde (m/z) esitettiin negatiivisesti varautuneina ioneina. Molekyylien kantajakaasuna käytettiin typpeä (N₂) ja törmäytyskaasuna heliumia (He). Aluksi testattiin sekä positiivista että negatiivista ionisaatiota. Negatiivipuolen [M-H]⁻ todettiin kuitenkin antavan voimakkaamman signaalin kuin positiivipuolen [M+H]⁺. Fragmentti-ionien ja molekyyli-ionien avulla tunnistettiin eri avenantramidimuotoja. Molekyyli-ionien ja niistä syntyneiden fragmentti-ionien tunnistuksessa käytettiin apuna De Bruijin ym. (2018) artikkelia.

Taulukko 12. Avenantramidien analysoinnissa käytetyn massaspektrometrin (Waters Synapt G2-Si, Milford, MA, USA) parametrit.

MS-parametrit	
Polariteetti	ES+/ES-
Kapillaarijännite (kV)	1,5
Ionisaatiolähteen lämpötila (°C)	120
Kartiojännite (V)	40
Ionisaatiolähteen jännite-ero (V)	80
Ionisaatiolähteen kaasuvirtaus (ml/min)	0
Kuivauskaasun lämpötila (°C)	500
Kartion kaasuvirtaus (L/Hr)	50
Haihdutuskammion kaasuvirtaus (L/Hr)	1000
Sumuttimen kaasupaine (Bar)	6
Lukkomassa (leusiini-enkefaliini, Da)	[M+H ⁺] m/z 556.2771 ([M-H] m/z 554.2615)

2.3.7 AVENANATRAMIDIEN TUTKIMINEN KAURATUOTTEISTA KEHITETYLLÄ MENETELMÄLLÄ

Tutkimuksessa kehitetyllä ja validoidulla UHPLC-menetelmällä analysoitiin tiettyjen kauratuotteiden avenantramidipitoisuudet. Kehitetty uuttomenetelmä on esitetty kaaviossa 1, ja kvantitointiin käytetty UHPLC-menetelmä on kuvattu taulukossa 16. Analysoitaviksi kauratuotteiksi valikoituivat täysjyväjauho, kauralese, kaurajuoma, kaurajogurtti,

nyhtökaura ja kaurajauhis. Kauratuotteet uutettiin etanoli:vesi-uuttoliuottimella (80:20) (jauho, lese, nyhtökaura, kaurajauhis) tai etanolilla (juoma, jogurtti) ilman fosfaattipuskuria. Näytemäärä vaihteli seuraavasti: 0,1 g (kaurajauho ja -lese), 0,2 g (nyhtökaura, kaurajauhis) ja 0,5 g (kaurajuoma ja -jogurtti). Uuttoliuottimen määräksi optimoitiin 1 ml, eli supernatantteja kerättiin kolme kertaa toistetusta uutosta yhteensä 3 ml.

Kauranäytteiden uutto toistettiin kolme kertaa ja näytteet valmistettiin rinnakkaisnäytteinä. Eppendorf-putkiin (Eppendorf AG, Hamburg, Saksa) punnittiin kauranäytettä. Sisäisen standardin kantaliuoksen laimennosta (1:50) lisättiin 75 µl (1,5 µg), minkä jälkeen uuttoliuotinta lisättiin 1 ml. Liuoksia sonikoitiin 10 minuutin ajan ja niitä sekoitettiin tasoravistelijassa 20 minuuttia (200 rpm). Liuoksia sentrifugoitiin lopuksi 5 minuutin ajan (3000 rpm, 20 °C), minkä jälkeen supernatantit kerättiin. Valmiit uutteen haihdutettiin kuiviksi tyypellä 40 °C:ssa (noin 3 h). Haihdutuksen nopeuttamiseksi liuoksiin lisättiin pieniä määriä etanolia. Kuiva-aine liuotettiin 200 µl:aan metanolia, liuos sekoitettiin Vortex-sekoittajalla ja suodatettiin (0,2 µm suodattimen läpi) näytepulloihin.

Näytteet analysoitiin optimoidulla UHPLC-PDA -menetelmällä, jossa ajoliuoksina oli 0,5 % muurahaishappoa vedessä (A) ja 0,5 % muurahaishappoa asetonitrilissä (B). Ajoaika oli 16 minuuttia, injektioilavuus 5 µl, kolonnin lämpötila 40 °C ja virtausnopeus 0,3 ml/min.

3. TULOKSET

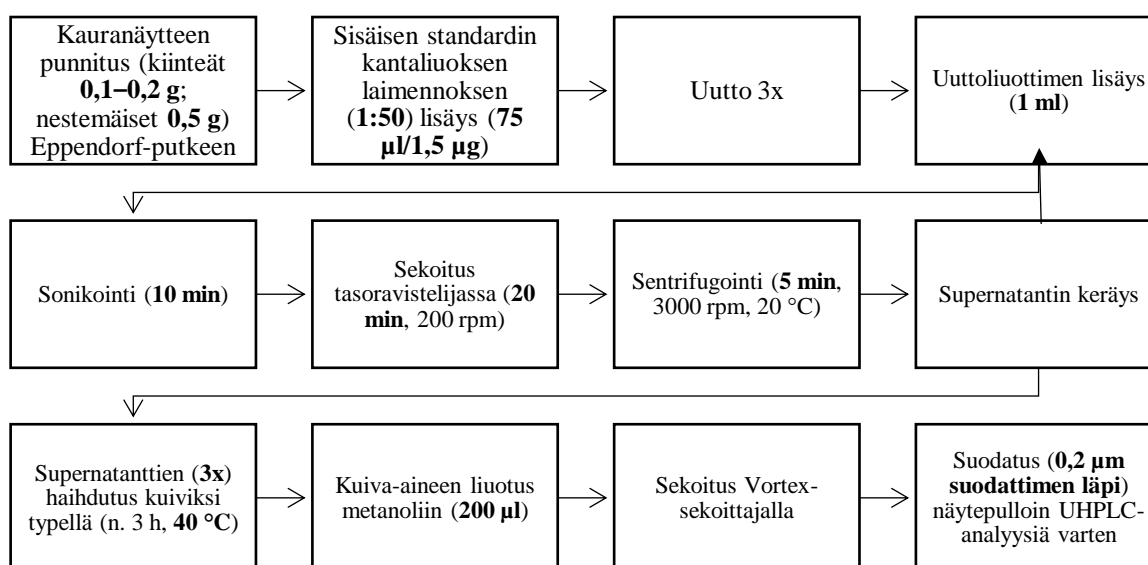
3.1 UUTON OPTIMOINTI

3.1.1 UUTTOLIUOTIN

Aventramidien määritetty pitoisuus oli suurin, kun kaurajauho uutettiin etanoli:vesi-uuttoliuottimella (80:20) ilman fosfaattipuskuria. Aluksi uuttoliuottimen määränä kokeiltiin 2+1+1 ml = 4 ml. Sen määrä pienennettiin kuitenkin 3 ml:aan (1+1+1), koska määrän pienentämisellä ei todettu olevan vaikutusta tuloksiin. Myös pienempi haihdutettavan liuottimen määrä oli eduksi. Haihdutettaessa liuoksia typpihaihduttimella haihdutusaika oli noin 1 h/1 ml, joten kun uuttoliuottimen määrä pieneni 1 ml:llä myös haihdutusaika pieneni noin tunnilla.

3.1.2 OPTIMOITU UUTTO

Tutkimuksessa optimoitu avenantramidien uuttomenetelmä on esitetty kaaviossa 1. Kauranäytteiden uutto toistettiin kolme kertaa ja näytteet valmistettiin rinnakkaisnäytteinä. Uuton peruskulku oli seuraava: uuttoliottimen lisäys, sonikointi, sekoitus tasoravistelijassa, sentrifugointi, supernatantin talteenotto (edellä mainittu kolme kertaa), supernatanttien haihdutus tyypellä, liuotus metanoliin ja suodatus näytepulloihin.



Kaavio 1. Kauratuotteiden avenantramidien optimoitu uutto.

3.1.3 JAUHATUKSEN, NÄYTEMÄÄRÄN JA UUTTOAJAN VAIKUTUS AVENANTRAMIDIEN PITOISUUKSIIN

Uuton tehokkuuden varmistamiseksi tutkittiin näytemäärän, jauhatusasteen ja uuttoajan vaikutusta määritettyihin avenantramidipitoisuuksiin. Taulukossa 13 on esitetty eri kaurajauhonäytteiden avenantramidipitoisuudet. Kun verrataan toisiinsa suuremman partikkelikoon jauhon ja partikkelikokoon 0,5 mm jauhetun jauhon tuloksia näytemäärällä 0,1 g, voidaan todeta, että kun jauhojen partikkelikokoa pienennettiin, avenantramidit uuttuivat paremmin, eli avenantramidien pitoisuudet suurenivat (15,7 µg/g vs. 17,9 µg/g) ja vaihtelu variaatiokertoimen mukaan pieneni huomattavasti (2p: 26,5 % vs. 22,8 %). Vaihtelu oli kuitenkin vielä melko suurta (suurta, jos CV % > 30). Kun uutto tehtiin käyttäen 0,5 g:n näytemäärää ja partikkelikokoon 0,5 mm jauhattua näytettä, havaitut avenantramidipitoisuudet suurenivat entisestään (17,9 µg/g vs. 21,3 µg/g) verrattuna

suuremman partikkelikoon jauhoon, jonka näytemäärä oli 0,1 g. Lisäksi pitoisuuksien vaihtelu pieneni (22,8 % vs. 6,5 %).

Taulukko 13. Partikkelikoon (suurempi partikkelikoko vs. partikkelikoko 0,5 mm) ja näytemäärän (0,1 g vs. 0,5 g) vaikutus kaurajauhon avenantramidien pitoisuuksiin ja niiden hajontaan (keskiarvo \pm keskihajonta (μ g/g tuorepainoa kohden) ja CV (%)) erilaisten uuttojen (3 x 20 min vs. yön yli) jälkeen.

Näyte	Paino (g)	Pitoisuus (μ g/g tuorepainoa kohden) ¹			
		2c	2f	2p	Yhteensä
kaurajauho (suurempi partikkelikoko, uutto 3 x 20 min, N=12)	0,1	6,6 \pm 1 (27)	5,5 \pm 1,5 (27,1)	3,6 \pm 1,8 (26,5)	15,7
kaurajauho (0,5 mm, uutto 3 x 20 min, N=4)	0,1	7,6 \pm 1,1 (14)	6,3 \pm 1,3 (20,6)	4 \pm 0,9 (22,8)	17,9
kaurajauho (0,5 mm, uutto 3 x 20 min, N=4)	0,5	9,1 \pm 0,2 (2,6)	7,5 \pm 0,5 (7,1)	4,7 \pm 0,3 (6,5)	21,3
kaurajauho (0,5 mm, uutto yön yli uutto, N=4)	0,1	11,8 \pm 2,1 (17,9)	9,2 \pm 1,8 (19,1)	6,4 \pm 1,4 (21,5)	27,4
kaurajauho (0,5 mm, uutto yön yli, N=4)	0,5	10,7 \pm 1,1 (10,2)	8,5 \pm 0,6 (6,7)	5,5 \pm 0,6 (10,5)	24,7

¹ Pitoisuuksien keskiarvo \pm keskihajonta (CV %).

Lisäksi tutkittiin uuttoajan pidentämisen vaikutusta määritettyihin avenantramidien pitoisuuksiin. Kun näytemäärä oli 0,1 g ja uuttoaika tasoravistelijassa oli 15 tuntia, mitatut avenantramidipitoisuudet suurensivat (17,9 μ g/g vs. 27,4 μ g/g) verrattuna 20 minuutin uuttoon tasoravistelijassa. Pitoisuuksien vaihteluun sillä ei toisaalta ollut juurikaan vaikutusta, koska variaatiokertoimet eivät pienentyneet suuresti (2p: 22,8 % vs. 21,5 %) uuttoajan pidentymisen myötä.

Kun käytettiin 0,5 g:n näytemäärää, avenantramidien pitoisuudet olivat suuremmat (21,3 μ g/g vs. 24,7 μ g/g) 15 tunnin uuton jälkeen kuin 20 minuutin uuton jälkeen. Pitoisuuksien välinen vaihtelu kuitenkin suureni keskimäärin (2p: 6,5 % vs. 10,5 %), kun uuttoaikaa pidennettiin. Kun uuttoaika piteni 20 minuutista 15 tuntiin, 0,1 g:n näytteiden määritetyt avenantramidipitoisuudet suurensivat enemmän kuin 0,5 g:n näytteiden määritetyt avenantramidipitoisuudet (9,5 μ g/g vs. 3,4 μ g/g). Tämän tutkimuksen perusteella suurimmat ja tasalaatuisimmat avenantramidien pitoisuudet saatiin, kun kaurajauho oli jauhettu partikkelikokoon 0,5 mm, näytemääränä oli 0,5 g ja uuttoaika oli 15 h.

3.1.4 KAURAJAUHON UUTTOJÄÄNNÖSTEN ANALYYSI

Kaikki uuttojäännökset sisälsivät vielä avenantramideja 1,5–5,6 µg/g (taulukko 14). Erityisen paljon avenantramideja oli jäänyt suuremman partikkelikoon 0,1 g:n kaurajauhon uuttojäännökseen (5,6 µg/g). Pitoisuuksien vaihtelu oli myös hyvin suurta (CV %=31,4–42,8 %). Avenantramidien määritetyt pitoisuudet uuttojäännöksissä pienenevät (5,6 µg/g vs. 2,9 µg/g) partikkelikoon pienentämisen ja vielä edelleen (2,9 µg/g vs. 2 µg/g) uuttoaajan pidentämisen seurauksena, eli kun uuttoaika tasoravistelijassa piteni 20 minuutista 15 tuntiin. Avenantramidien pitoisuuksien vaihtelu pieneni (2p: 42,8 % vs. 38,4%) 0,1 g:n näytteillä partikkelikoon pienentämisen jälkeen ja vielä entisestään (2p: 38,4 % vs. 14,5 %) uuttoaajan pidentämisen jälkeen.

Taulukko 14. Partikkelikoon (suurempi partikkelikoko vs. partikkelikoko 0,5 mm) ja näytemäärän (0,1 g vs. 0,5 g) vaikutus kaurajauhon uuttojäännösten avenantramidien pitoisuuksiin ja niiden hajontaan (keskiarvo±keskihajonta (µg/g tuorepainoa kohden) ja CV (%)) erilaisten uuttojen (3 x 20 min vs. yön yli) jälkeen.

Näyte	Paino (g)	Pitoisuus (µg/g tuorepainoa kohden) ¹			
		2c	2f	2p	Yhteensä
kaurajauho (suurempi partikkelikoko, uutto 3 x 20 min, N=3)	0,1	2,5±0,8 (31,4)	1,8±0,8 (43,7)	1,3±0,5 (42,8)	5,6
kaurajauho (0,5 mm, uutto 3 x 20, N=4)	0,1	1,2±0,1 (10,7)	1±0,3 (25,4)	0,7±0,3 (38,4)	2,9
kaurajauho (0,5 mm, uutto 3 x 20, N=4)	0,5	1,1±0,2 (19,1)	0,9±0,2 (21)	0,5±0,1 (20)	2,5
kaurajauho (0,5 mm) uutto yön yli (N=4)	0,1	0,9±0,1 (14,8)	0,6±0,1 (11,9)	0,5±0,1 (14,5)	2
kaurajauho (0,5 mm) uutto yön yli (N=4)	0,5	0,7±0,1 (18,7)	0,5±0,1 (20)	0,3±0,1 (19,4)	1,5

¹ Pitoisuuksien keskiarvo±keskihajonta (CV %).

Avenantramidien havaitut pitoisuudet uuttojäännöksissä (0,5 g) pienenevät (2,5 µg/g vs. 1,5 µg/g) uuttoaajan pidentämisen seurauksena, eli kun uuttoaika tasoravistelijassa piteni 20 minuutista 15 tuntiin. Kun uuttoaikaa pidennettiin, avenantramidien pitoisuuksien vaihtelu pieneni enää vain hieman (2p: 20 % vs. 19,4 %) verrattaessa 0,5 g:n näytteitä.

Kun näytemääränä oli 0,5 g, uuttojäännöksessä oli vähemmän avenantramideja 20 minuutin uuton (2,9 µg/g vs. 2,5 µg/g) ja yön yli uuton (15 h) jälkeen (2 µg/g vs. 1,5 µg/g) kuin 0,1 g:n uuttojäännöksessä. Avenantramidien pitoisuudet uuttojäännökselle vaihtelivat vähemmän käytettäessä suurempaa (0,5 g) näytemäärää kuin pientä (0,1 g) näytemäärää (2p:

38,4 % vs. 20 %) 20 minuutin uuton jälkeen. Kun uuttoaikaa oli pidennetty, avenantramidien pitoisuudet uuttojäännökselle vaihtelivat enemmän käytettäessä suurempaa (0,5 g) näytemäärää kuin pientä (0,1 g) näytemäärää (2p: 19,4 % vs. 14,5 %).

Taulukossa 15 on esitetty alkuperäisestä uutosta ja siitä muodostuneen uuttojäännöksen uutosta saatujen avenantramidien yhteenlasketut pitoisuudet. Myös näistä tuloksista nähdään, että määritetyt avenantramidipitoisuudet olivat suuremmat partikkelikokoon 0,5 mm jauhetuissa ja yön yli (15 h) uutetuissa näytteissä kuin suuremman partikkelikoon näytteissä ja näytteissä, joita oli uutettu vain 20 minuuttia tasoravistelijassa. Kun näytemäärä oli 0,5 g, avenantramidien pitoisuudet olivat suuremmat kuin 0,1 g:n näytteessä (23,8 µg/g vs. 20,9 µg/g), kun uuttoaika oli 20 minuuttia. Toisaalta kun uutto kesti 15 tuntia, 0,1 g:n näytteessä avenantramidien pitoisuudet olivat suuremmat kuin 0,5 g:n näytteessä (29,3 µg/g vs. 26,2 µg/g). Tulokset olivat kuitenkin lähellä toisiaan, kun laskettiin yhteen avenantramidien pitoisuus uuttojäännöksessä ja pitoisuus alkuperäisen uuton jälkeen.

Taulukko 15. Kaurajauhojen (suurempi partikkelikoko vs. partikkelikoko 0,5 mm ja 0,1 g vs. 0,5 g) alkuperäisissä uutoissa (3 x 20 min vs. yön yli) ja niistä muodostuneiden uuttojäännösten uutoissa (3 x 20 min) uuttuneiden avenantramidien pitoisuuksien keskiarvot (µg/g tuorepainoa kohden).

Näyte	Paino (g)	Pitoisuus (µg/g tuorepainoa kohden) ¹			
		2c	2f	2p	Yhteensä
kaurajauho (suurempi partikkelikoko, uutto 3 x 20 min, N=3)	0,1	8,7	6,9	4,9	20,5
kaurajauho (0,5 mm, uutto 3 x 20 min, N=4)	0,1	8,8	7,3	4,8	20,9
kaurajauho (0,5 mm, uutto 3 x 20 min, N=4)	0,5	10,2	8,4	5,2	23,8
kaurajauho (0,5 mm) uutto yön yli (N=4)	0,1	12,7	9,8	6,8	29,3
kaurajauho (0,5 mm) uutto yön yli (N=4)	0,5	11,4	9	5,8	26,2

¹Pitoisuuksien keskiarvo

3.2 UHPLC-ANALYYSI JA AJO-OLOSUHTEIDEN OPTIMOINTI

Tutkimuksessa optimoitu avenantramidien kvantitointiin käytetty UHPLC-menetelmä, jolla saavutettiin paras avenantramidien erottuminen kromatografisten parametrien perusteella, on esitetty taulukossa 16. Erottelevimmiksi ajoliuoksiksi osoittautuivat 0,5 % muurahaishappoa vedessä (A) ja 0,5 % muurahaishappoa asetonitriilissä (B). Kun käytettiin 0,1 % muurahaishappoa vedessä ja asetonitriilissä, avenantramidit eluoutuivat hieman myöhemmin kuin 0,5-prosenttisilla liuoksilla. Analyysin lämpötilaksi optimoitiin 40 °C ja

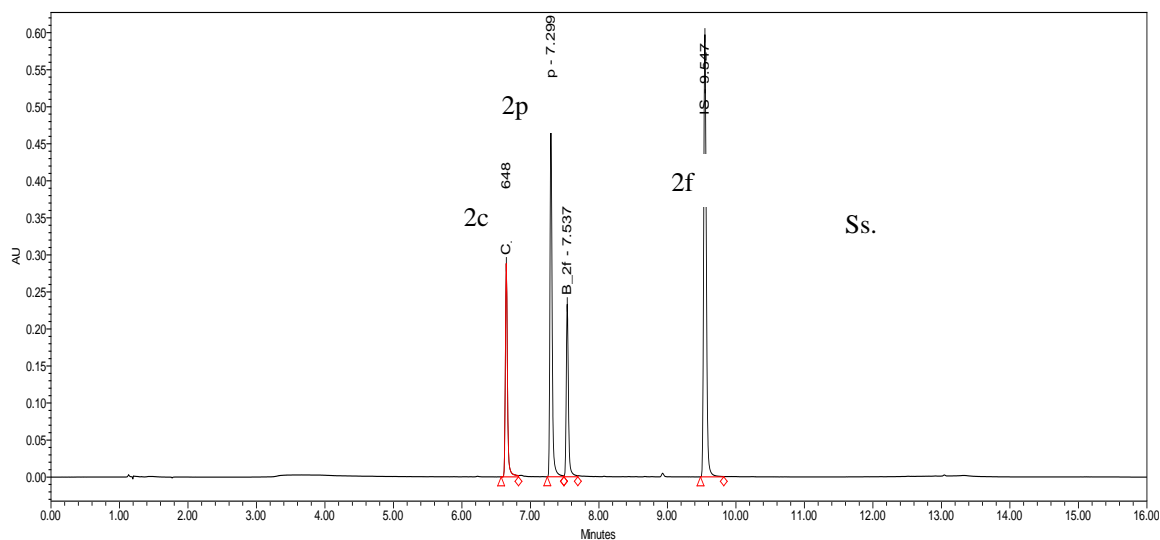
virtausnopeudeksi 0,3 ml/min. Ne pysyivät vakiona UHPLC-ajojen aikana. Virtausnopeutena kokeiltiin 0,28 ml/min, kun 2p- ja 2f-muotojen piikkejä yritettiin saada eluoitumaan hieman kauempana toisistaan. Resoluutio oli kuitenkin parempi virtausnopeudella 0,3 ml/min kuin virtausnopeudella 0,28 ml/min.

Taulukko 16. Optimoitu avenantramidien kvantitointiin käytetty UHPLC-menetelmä.

Optimoitu UHPLC-analyysi	
Detektori	PDA
Kolonne (mm) (C18)	2,1 x 150
Halkaisija (µm)	1,8
Liikkuva faasi	
A	0,5 % muurahaishappoa vedessä
B	0,5 % muurahaishappoa asetonitrilissä
Gradientti (A:B)	0–1 min (95:5); 1–8 min (50:50); 8–10 min (50:50); 10–12 min (20:80); 14–16 min (95:5)
Kolonnin lämpötila (°C)	40
Injektioilavuus (µl)	5
Virtausnopeus (ml/min)	0,3
Detektioaallonpituus (nm)	320

Tutkimuksessa käytetty gradientti valittiin, koska avenantramidien piikit erottuivat toisistaan hyvin ja piikit olivat symmetrisiä. Ajoaika, joka oli 16 minuuttia, osoittautui sopivaksi. Lisäksi sisäinen standardi eluoitui tutkittavien yhdisteiden jälkeen sopivassa paikassa eikä siis peittänyt muita yhdisteitä. Ajoajan lyhentämisestä (15 min) johtuvan gradientin muuttumisen takia piikit eluoituivat myöhemmin ja piikit olivat lyhyempiä kuin silloin, kun ajoaika oli 16 minuuttia.

Avenantramideista ensin eluoitui 2c-muoto (6,6 min), toisena eluoitui 2p-muoto (7,3 min) ja viimeisenä 2f-muoto (7,5 min). Sisäinen standardi eluoitui näiden muotojen jälkeen (9,5 min). Tutkimuksessa todettiin 2f- ja 2p-muotojen eluoituvan peräkkäin hyvin lähellä toisiaan. Näitä kahta muotoa yritettiin saada eluoitumaan hieman kauempana toisistaan erilaisilla gradienteilla siinä kuitenkaan onnistumatta. 2f_d- ja 2p_d-muodot eluoituivat puolestaan 2f-muodon ja sisäisen standardin välissä. Avenantramidien ja sisäisen standardin retentioaikojen keskihajonta oli keskimäärin vain noin 0,002 min, eli retentioajat olivat hyvin stabiilit. Avenantramidit detektoitiin 320 nm:n aallonpituudella. Kuvassa 3 on esitetty standardiseoksen UHPLC-kromatogrammi (virtausnopeudella 0,3 ml/min, lämpötilassa 40 °C).



Kuva 3. Avenantramidistandardeja ja sisäistä standardia sisältävän standardiseoksen UHPLC-kromatogrammi (detektioaallonpituus: 320 nm, ajoliuokset: 0,5 % muurahaishappoa vedessä (A) ja 0,5 % muurahaishappoa asetonitrilissä (B), virtausnopeus: 0,3 ml/min, kolonnin lämpötila: 40 °C), jossa avenantramidien retentioajat olivat 6,6 min (2c), 7,3 min (2p) ja 7,5 (2f). Sisäisen standardin retentioaika oli 9,5 min. Gradientti on esitetty taulukossa 16.

3.3 MENETELMÄN VALIDOINTI

Ensin valittiin soveltuvin gradientti standardiseosta käyttäen ja sitten kun oli todettu parhaat olosuhteet perustuen kromatografisiin parametreihin (tailing, resoluutio, pohjaluku ym.), menetelmä validoitiin.

Kromatografisen menetelmän erotuskykyä kuvaavat validointiparametrit määritettiin käyttäen kaurajauhoa näytteenä (taulukko 17). Validointiparametrien arvoja verrattiin FDA:n (Elintarvike- ja lääkevirasto, engl. Food and Drug Administration) vertailuarvoihin (FDA 1994) ja saadut arvot todettiin hyväksyttäviksi. Tulosten välinen vaihtelu oli myös todella pientä, mikä kertoo menetelmän luotettavuudesta ja toistettavuudesta.

Taulukko 17. Avenantramidien UHPLC-menetelmän validointiparametrien keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

Tunnusluku	Avenantramidi	Retentioaika (min)	Pinta-ala	USP-resoluutio	USP-häntimistekijä	Retentiotekijä, k	USP-pohjaluku (e+005)
Keskiarvo¹	2p	7,3	178944,7	11,5	1,3	7,1	2,7
	2f	7,5	117852,5	4,3	1,2	7,4	2,9
	2c	6,6	177677,5	-	-	6,4	2,4
	ss. ²	9,5	99108,4	31,9	1,1	9,6	3,2
Keskihajonta¹	2p	0,003	44061,7	0,1	0,03	0,004	0,04
	2f	0,002	28531,9	0,02	0,03	0,002	0,1
	2c	0,002	47491,6	-	-	0,002	0,05
	ss. ²	0,002	5114,4	0,2	0,0	0,002	0,01
CV %¹	2p	0,000	24,6	1,0	2,2	0,1	1,4
	2f	0,000	24,2	0,4	2,3	0,0	1,9
	2c	0,000	26,7	-	-	0,0	1,9
	ss. ²	0,000	5,2	0,5	0,9	0,0	0,4

¹kaurajauho, N=12, ²ss. = sisäinen standardi

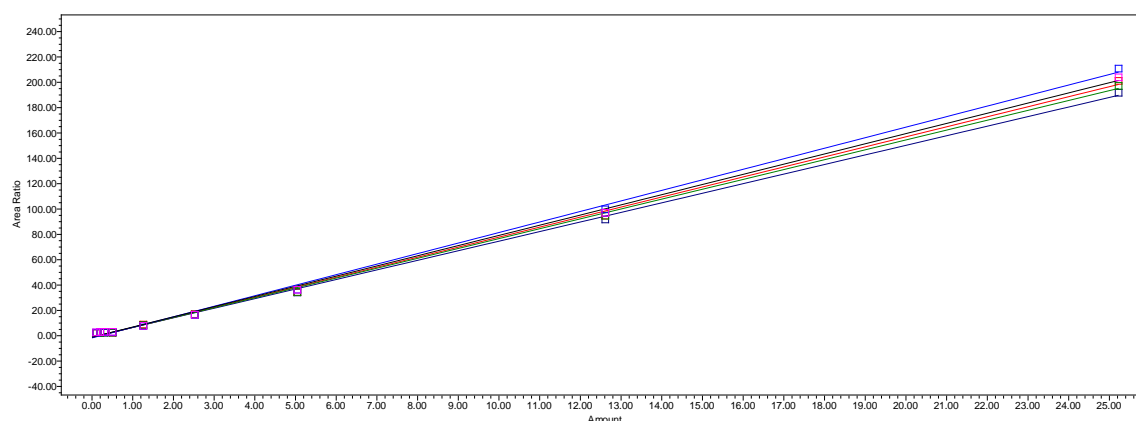
Lineaarisuus

Avenantramidien vasteiden lineaarisuutta tutkittiin pitoisuusalueella 0,1–5 ng/μl päivien sisäisenä ja päivien välisenä vaihteluna. Taulukossa 18 on esitetty 2c-, 2f- ja 2p-muotojen standardisuorien R^2 -arvojen keskiarvot päivän sisäisille ja päivien välisille tuloksille.

Taulukko 18. Avenantramidien 2c-, 2f- ja 2p-muotojen standardisuorien R^2 -arvojen keskiarvo±keskihajonta päivän sisäisille ja päivien välisille tuloksille, jotka saatiin UHPLC-laitteistolla.

R^2 -arvot	2c	2f	2p
Päivän sisällä (N=3)	0,9984±0,00026	0,9986±0,00026	0,9988±0,00025
Päivien välillä (N=5)	0,9983±0,00028	0,9988±0,00027	0,9987±0,00027

R^2 -arvot olivat hyvin lähellä toisiaan niin päivän sisäisessä kuin päivien välisessä vertailussa. R^2 -arvo oli kaikille kolmelle muodolle keskimäärin 0,9986. Kuvassa 4 on esitetty avenantramidi 2p:n vasteen lineaarisuutta kuvaavat standardisuorat.



Kuva 4. Avenantramidi 2p:n vasteen lineaarisuutta kuvaavat standardisuorat pitoisuusalueella 0,1–5 ng/μl injektioilavuuden ollessa 5 μl.

Menetelmän toistettavuus

Menetelmän toistettavuutta testattiin tekemällä rinnakkaismäärittäyksiä kaurajauholle (N=12) ja kaurajogurtille (N=12). Taulukossa 19 on esitetty kaurajauhon ja kaurajogurtin toistokokeiden tulokset. Toistettavuutta arvioitiin vertailemalla tulosten variaatiokertoimia (CV %). Avenantramidien pitoisuudet kaurajauholle vaihtelivat enemmän käytettäessä pientä (0,1 g) näytemäärää kuin suurta (0,5 g) näytemäärää (2p: 26,5 % vs. 6,5 %). Avenantramidien pitoisuudet kaurajogurtille vaihtelivat vähemmän kuin 0,5 g:n kaurajauhonäytteille (2p: 6,5 % vs. 5,2 %)

Taulukko 19. Avenantramidien pitoisuuksien keskiarvo±keskihajonta ($\mu\text{g/g}$ tuorepainoa kohden) ja CV (%) kaurajauholle (näytämäärille 0,1 g ja 0,5 g) ja kaurajogurtille (näytämäärälle 0,5 g) toistokokeissa.

Tuote	Pitoisuus ($\mu\text{g/g}$ tuorepainoa kohden) ¹		
	2c	2f	2p
Kaurajauho (0,1 g, N=12)	6,6±1,0 (27,0)	5,5±1,5 (27,1)	3,6±1,8 (26,5)
Kaurajauho (0,5 g, N=4)	9,1±0,2 (2,6)	7,5±0,5 (7,1)	4,7±0,3 (6,5)
Kaurajogurtti (0,5 g, N=12)	0,9±0,03 (5,4)	1,4±0,07 (5,2)	0,7±0,05 (5,2)

¹ Pitoisuuksien keskiarvo±keskihajonta (CV %).

UHPLC-laitteiston toistotarkkuus näytettä analysoitaessa

Kauralesenäytteitä (N=3) injektioitiin neljä kertaa UHPLC-laitteen toistotarkkuuden selvittämiseksi. Pitoisuuksien määrittämiseen käytettiin aina samoja standardisuoria. Kauralesenäytteiden injektioiden toiston perusteella saadut avenantramidien pitoisuuksien keskiarvot, hajonnat ja CV % on esitetty taulukossa 20.

Taulukko 20. Kauralesenäytteiden yhden näytteen kaikkien injektioiden ja kolmen rinnakkaisnäytteen kaikkien injektioiden avenantramidien pitoisuuksien keskiarvo±keskihajonta ($\mu\text{g/g}$ tuorepainoa kohden) ja CV (%).

Avenantramidi	Pitoisuus ($\mu\text{g/g}$ tuorepainoa kohden)	CV %
Inj. väliset¹ (N=4)		
2p	8,0±0,1	0,7
2f	17,4±0,2	0,9
2c	13,0±0,2	1,3
Kaikki inj.² (N=12)		
2p	7,1±0,7	9,3
2f	15,5±1,4	9,3
2c	12,2±0,9	7,1

¹ Yhden näytteen kaikki injektiot (N=4).

² Kolmen rinnakkaisnäytteen kaikki injektiot (N=12).

Avenantramidien pitoisuudet vaihtelivat vain vähän eri injektioiden välillä (CV%=0,7 %–1,3 %), kun kyseessä oli sama näyte. Erot pitoisuuksissa injektioiden välillä olivat siis pieniä näytteen sisällä, mutta verrattaessa rinnakkaisnäytteiden kaikkia injektioita havaittiin enemmän vaihtelua (CV % = 7,1 %–9,3 %). Vaihtelu oli kuitenkin pientä (suurta, jos CV % > 30).

Saanto

Suurimmat saannot avenantramideille saavutettiin 0,5 g:n näytteillä: 99 % (2c), 106 % (2f) ja 117 % (2p) (taulukko 21). Avenantramideista 2p-muodon saanto oli suurin ja 2c-muodon saanto oli pienin. Molempien näytemäärien kohdalla saantojen vaihtelu pieneni huomattavasti, kun standardeja lisättiin enemmän. Saannot olivat suurempia suuremmalla lisäystasolla suurempaan näytemäärään kuin pienemmällä lisäystasolla pienempään näytemäärään.

Taulukko 21. Avenantramidien saantojen keskiarvo \pm keskihajonta (%) ja CV (%) kaurajauhossa kahdella eri näytemäärällä (0,1 g ja suurempi partikkelikoko vs. 0,5 g ja partikkelikoko 0,5 mm) ja kahdella/kolmella standardien lisäystasolla.

Näyte	Paino (g)	Std. määrä näytteessä (μ g)	Ss. ² määrä näytteessä (μ g)	Saanto (%) ³		
				2c	2f	2p
Kaurajauho (suurempi partikkelikoko)¹	0,1	0,25	1,5	61,7 \pm 34,5 (55,8)	77,3 \pm 25,8 (33,4)	92,9 \pm 14,1 (15,2)
Kaurajauho (suurempi partikkelikoko)¹	0,1	0,5	1,5	53,9 \pm 23,5 (43,6)	54,9 \pm 16,6 (30,3)	75,7 \pm 11,1 (14,6)
Kaurajauho (suurempi partikkelikoko)¹	0,1	2	1,5	59,6 \pm 5,2 (8,8)	61,8 \pm 2,5 (4,1)	83 \pm 3,6 (4,3)
Kaurajauho (0,5 mm)¹	0,5	2,5	6	53,4 \pm 12,4 (23,2)	61,8 \pm 9,1 (14,7)	69,2 \pm 16,2 (23,4)
Kaurajauho (0,5 mm)¹	0,5	10	6	99 \pm 1,7 (1,8)	106 \pm 3 (2,8)	117,4 \pm 3 (2,6)

¹N=4, ²ss. = sisäinen standardi, ³saannon keskiarvo \pm keskihajonta (CV %).

Toteamis- ja määritysrajat

Menetelmän toteamis- ja määritysrajat avenantramideille standardiliuoksessa (ng/ml) ja näytteessä (ng/g) on esitetty taulukossa 22. Kehitetyn UHPLC-menetelmän toteamisrajaksi avenantramideille 2p, 2f ja 2c määritettiin 19 ng/g, 20 ng/g ja 20 ng/g ja määritysrajaksi vastaavasti 56 ng/g, 61 ng/g ja 59 ng/g. Standardiliuoksesta injektioitujen avenantramidien toteamisraja oli keskimäärin 53 ng/ml (0,27 ng/inj.) ja määritysraja 158 ng/ml (0,79 ng/inj.). Avenantramidien toteamis- ja määritysraja perustuu injektio-tilavuudelle 5 μ l ja 0,1 g:n näytteelle, joka on käynyt läpi uuton, haihdutuksen, ja konsentroidin optimoidun uuton mukaan. Valmiista uutteesta (200 μ l) tehtiin laimennos 1:10 metanoliin eli uute oli loppuvaiheessa 1000 μ l:ssa.

Taulukko 22. Toteamis- ja määrittämisraajat avenantramideille standardiliuoksessa (ng/ml) ja näytteessä (ng/g).

Näyte	Toteamisraja	Määrittämisraja
Std. liuokselle (ng/ml) (N=4)		
2p	51	151
2f	55	164
2c	53	158
Näytteelle (ng/g) (N=4)¹		
2p	19	56
2f	20	61
2c	20	59

¹Näyte on ohrajauhoa.

3.4 KAURATUOTTEIDEN AVENANTRAMIDIPITOISUUDET

Tutkimuksessa kehitetyllä ja validoidulla UHPLC-menetelmällä määritettiin avenantramidipitoisuudet valikoiduista kauratuotteista. Tuotteiksi valikoituivat täysjyväkaurajauho, kauralese, kaurajuoma, kaurajogurtti, nyhtökaura ja kaurajauhis. Kauratuotteet uutettiin kolme kertaa etanoli:vesi-uuttoliuottimella (80:20) (jauho, lese, nyhtökaura, kaurajauhis) tai etanolilla (juoma, jogurtti) ilman fosfaattipuskuria ja näytemäärä vaihteli 0,1–0,5 g. Näytteet analysoitiin optimoidulla UHPLC-PDA -menetelmällä. Analysoitujen kauratuotteiden avenantramidien pitoisuudet on esitetty taulukossa 23.

Taulukko 23. Avenantramidien pitoisuuksien keskiarvo±keskihajonta (µg/g tuorepainoa kohden) ja CV (%) kauratuotteissa.

Tuote	Paino (g)	Pitoisuus (µg/g tuorepainoa kohden) ¹			
		2c	2f	2p	Yhteensä
Kaurajauho (N=12)	0,1	6,6±1,0 (27,0)	5,5±1,5 (27,1)	3,6±1,8 (26,5)	15,7
Kauralese (N=6)	0,1	8,4±1,9 (23,3)	18,3±3,1 (17,2)	14,6±3,4 (23,1)	41,3
Kaurajuoma (N=3)	0,5	1,0±0,03 (2,6)	2,5±0,08 (3,3)	1,0±0,03 (2,8)	4,5
Kaurajogurtti (N=12)	0,5	0,9±0,03 (5,4)	1,4±0,07 (5,2)	0,7±0,05 (5,2)	3
Nyhtökaura (N=4)	0,2	2,4±0,1 (9,6)	4,6±0,3 (5,7)	2,2±0,2 (5,2)	9,2
Kaurajauhis (N=4)	0,2	5,9±0,1 (2,7)	8,9±0,2 (2,7)	4,9±0,2 (2,6)	19,7

¹ Pitoisuuksien keskiarvo±keskihajonta (CV %).

Avenantramidien kokonaispitoisuus vaihteli välillä 3–41,3 µg/g tuorepainoa kohden. Tulosten perusteella voitiin todeta, että pitoisuudet pienenevät seuraavassa järjestyksessä: lese>kaurajauhis>jauho>>nyhtökaura>juoma>jogurtti. Kauraleseessä oli avenantramideja

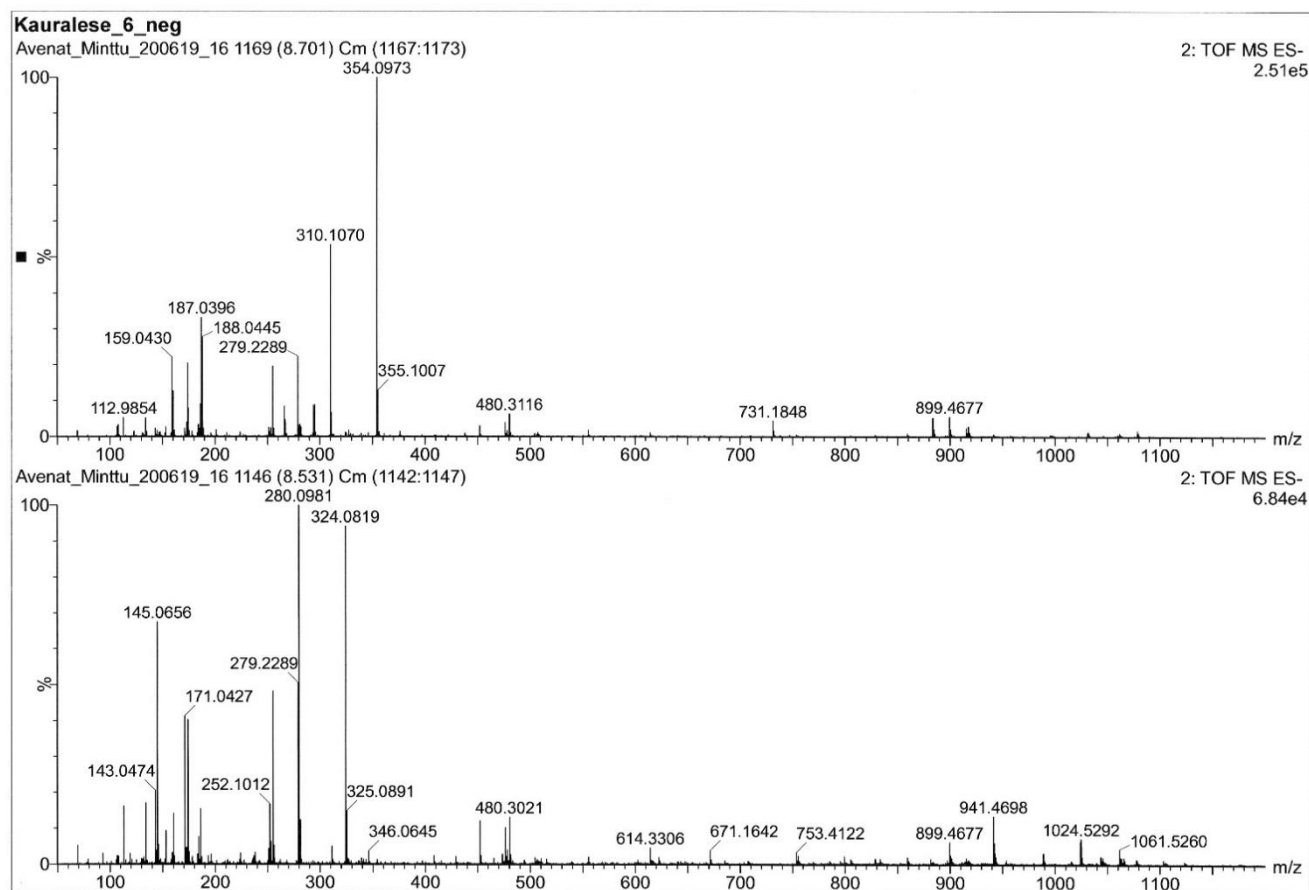
noin kolme kertaa enemmän kuin kaurajauhossa (41,3 µg/g vs. 15,7 µg/g). Kaurajuomassa oli 1,5 kertaa enemmän avenantramideja kuin kaurajogurtissa (4,5 µg/g vs. 3 µg/g). Kaurajauhiksessa oli puolestaan noin kaksi kertaa enemmän avenantramideja kuin nyhtökaurassa (19,7 µg/g vs. 9,2 µg/g).

Täysjyväkaurajauhossa avenantramidien pitoisuudet pienenevät seuraavasti: 2c (42 %)>2f (35 %)>2p (23 %). Kauraleseessä 2f-muotoa oli enemmän (44,3 %) kuin muita muotoja. Kuitenkin myös 2p-muotoa oli enemmän (35,4 %) 2c-muotoon verrattuna (20,3 %). Kaurajogurtissa ja -juomassa myös muotoa 2f oli eniten (46,7 % ja 55,6 %) ja 2c- ja 2p-muotoja oli lähes saman verran (30 % ja 22,2 % vs. 23,3 % ja 22,2 %). Kaurajuoman avenantramidien pitoisuudet olivat myös hyvin samansuuruisia keskenään eri rinnakkaisnäytteissä. Kaurajogurtin ja -juoman tapaan myös nyhtökaurassa muotoa 2f oli eniten (50 %) ja 2c- ja 2p-muotoja oli lähes saman verran (26 % vs. 24 %). Myös kaurajauhiksessa 2f-muotoa esiintyi eniten (45,1 %). Lisäksi 2c-muotoa oli vähän enemmän (30 %) verrattuna 2p-muotoon, jota oli siis vähiten (24,9 %). Kauratuotteiden UHPLC-kromatogrammit on esitetty liitteissä (liitteet 1–5).

3.5 AVENANTRAMIDIEN 2f_d JA 2p_d ANALYYSI

3.5.1 UHPLC-QTOF-MS -ANALYYSI

Kauratuotteista uutettujen avenantramidimuotojen 2 c, 2f ja 2p tunnistuksen varmistamiseen sekä harvinaisempien muotojen tunnistukseen käytettiin UHPLC-QTOF-MS -laitteistoa. Molekyyli-ionien ja niistä syntyneiden fragmentti-ionien tunnistuksessa käytettiin apuna De Bruijnin ym. (2018) tutkimuksen artikkelia. Kauraleseestä tunnistettiin avenantramidien 2f_d- ja 2p_d-muotoja UHPLC-QTOF-MS -laitteistolla. Analysoimisessa käytettiin aluksi positiivista ionisaatiota, mutta negatiivisella ionisaatiolla saatiin voimakkaampi signaali. Avenantramidien 2f_d ja 2p_d UHPLC-QTOF-MS -spektri on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Kauraleseen 2f_d- (ylempi) ja 2p_d-muotojen (alempi) massaspektrit, joista erottuivat [M-H]-molekyyli-ionit 354 m/z (2f_d) ja 324 m/z (2p_d) sekä syntyneet negatiiviset fragmentti-ionit 310 m/z, 159 m/z ja 187 m/z (2f_d) ja 280 m/z, 171 m/z ja 145 m/z (2p_d).

MS-spektristä tunnistettiin deprotonoitunut molekyyli-ioni $[M_{AV-H}]^-$ 2f_d, 354 m/z ja sen fragmentti-ioni $[M_{AV-H-CO_2}]^-$ 310 m/z. 2p_d-muodon MS-spektristä tunnistettiin puolestaan deprotonoitunut molekyyli-ioni $[M_{AV-H}]^-$ 324 m/z ja sen fragmentti-ioni $[M_{AV-H-CO_2}]^-$ 280 m/z. Avenantramidien 2f_d ja 2p_d [M-H]-molekyyli-ionit ja niiden negatiiviset fragmentti-ionit (MS/MS) on esitetty taulukossa 24.

Taulukko 24. Avenantramidien 2f_d ja 2p_d [M-H]-molekyyli-ionit ja niiden negatiiviset fragmentti-ionit (MS/MS).

Avenantramidi	R _t (min)	[M-H]-Molekyyli-ioni m/z	Syntyneet negatiiviset fragmentti-ionit m/z
2f _d	17,26	354	310, 159, 187
2p _d	16,14	324	280, 171, 145

3.5.2 AVENANTRAMIDIEN 2f_d JA 2p_d PITOISUUDET

Kun LC-MS -menetelmällä oli saatu varmistus, että retentioajoilla 17,26 min ja 16,14 min eluoituvat avenantramidit olivat muotoja 2f_d ja 2p_d, niiden pitoisuudet laskettiin ulkoisen standardin menetelmällä käyttäen muodon 2p standardisuuraa. Määritetyt pitoisuudet ja hajonnat on esitetty taulukossa 25.

Taulukko 25. Avenantramidien 2f_d ja 2p_d pitoisuuksien keskiarvo±keskihajonta (µg/g tuorepainoa kohden) ja CV (%) kaurajauhossa (0,1 g ja 0,5 g, partikkelikoko 0,5 mm) ja kaurajauhiksessa (0,2 g).

Tuote	Paino (g)	Pitoisuus (µg/g tuorepainoa kohden) ¹		
		2f _d	2p _d	Yhteensä
Kaurajauho (0,5 mm) ²	0,1	1,1±0,1 (11,2)	1,0±0,1 (10,4)	2,1
Kaurajauho (0,5 mm) ²	0,5	1,4±0,1 (5,9)	1,3±0,1 (8,1)	2,7
Kaurajauhis ²	0,2	3,4±0,1 (3,6)	3,1±0,1 (3,3)	6,5

¹Pitoisuuksien keskiarvo±keskihajonta (CV %), ²N=3

Kun näytemääränä oli 0,1 g, määritettiin kaurajauhoista 2f_d-muotoa 1,1 µg/g ja 2p_d-muotoa 1,0 µg/g. Kun näytemääränä oli 0,5 g, mitatut pitoisuudet suurensivat: 2f_d-muoto 1,1 µg/g vs. 1,4 µg/g ja 2p_d-muoto 1,0 µg/g vs. 1,3 µg/g. Avenantramidia 2f_d oli täysjyväkaurajauhossa 2,1 µg/g, joka oli 4,8–5,3 % avenantramidien 2c, 2f, 2p, 2f_d ja 2p_d yhteismäärästä. Avenantramidia 2p_d oli täysjyväkaurajauhossa puolestaan noin 2,7 µg/g, joka oli 4,3–4,9 % avenantramidien 2c, 2f, 2p, 2f_d ja 2p_d yhteismäärästä. Kaurajauhiksessa 2f_d- ja 2p_d-muotoja oli vastaavasti 3,4 µg/g ja 3,1 µg/g. Kaurajauhiksessa näitä kahta muotoa oli noin kolminkertaisesti verrattuna kaurajauhoon (6,5 µg/g vs. 2,1 µg/g) ja 11,8–13 % avenantramidien 2c, 2f, 2p, 2f_d ja 2p_d yhteismäärästä.

4. POHDINTA

4.1 UUTON OPTIMOINTI

Avenantramidien uuttomenetelmää kehitettäessä tutkittiin uuttoliuottimen, näytemäärän, näytteen jauhatustasteen ja uuttoaajan vaikutusta määritettyihin avenantramidipitoisuuksiin. Lisäksi kaurajauhon uuton uuttojäännökset analysoitiin uudelleen uuton tehokkuuden tutkimiseksi. Avenantramidit uuttuivat parhaiten, eli niiden määritetyt pitoisuudet olivat suurimmat, kun ne uutettiin 1 ml:llä etanoli:vesi-uuttoliuotinta (80:20) (jauho, lese, nyhtökaura, kaurajauhis) tai etanolia (juoma, jogurtti) ilman fosfaattipuskuria. Lisäksi kaurajauhon partikkelikoon pienentäminen, näytemäärän suurentaminen (0,1 g vs. 0,5 g) ja uuttoaajan pidentäminen (20 min vs. 15 h) mahdollistivat tehokkaimman avenantramidien uuttumisen.

Uuttoliuotin

Tässä työssä määritetyt avenantramidipitoisuudet olivat suurimmat, kun kauratuotteet uutettiin etanoli:vesi-uuttoliuottimella (80:20) (jauho, lese, nyhtökaura, kaurajauhis) tai etanolilla (juoma, jogurtti) ilman fosfaattipuskuria. Tutkimuksissa onkin käytetty pääasiassa alkoholipohjaisia uuttoliuottimia (Jastrebova 2006). 80-prosenttista etanolia käyttivät myös esimerkiksi Jastrebova ym. (2006). Avenantramidien uuttoliuottimena on käytetty kuitenkin myös 80-prosenttista metanolia (Mattila ym. 2005, Kaur ym. 2016, Multari ym. 2018) ja 80-prosenttista etanolia fosfaattipuskurissa (Xie ym. 2017, Pridal ym. 2018).

Erilaisten alkoholipohjaisten uuttoliuottimien käyttö voi kertoa siitä, että erot liuottimien välillä ovat pieniä. Toisin sanoen avenantramidit uuttuvat niillä hyvin, vaikka vertailuissa joidenkin niistä on todettu johtavan parempaan avenantramidien uuttuvuuteen kuin toisten. Esimerkiksi Pridalin ym. (2018) totesivat, että 80-prosenttinen etanoli fosfaattipuskurissa johti parempaan uuttoon kuin 100-prosenttinen metanoli.

Näytemäärä

Kehitetty Eppendorf-mittakaavainen uuttomenetelmä toimii tietyille 0,1 g:n näytteille, mutta täytyy tiedostaa, että uuttojäännökseen jää jonkun verran avenantramideja. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella todettiin, että käytettäessä uutossa 0,5 g:n näytettä

avenantramidien määritetyt pitoisuudet olivat suurempia (16 %) ja rinnakkaisten näytteiden kesken oli vähemmän hajontaa kuin käytettäessä 0,1 g:n näytettä. Toisaalta pienemmällä näytemäärällä on vähemmän haihdutettavaa.

Suurennettaessa näytemäärää uuttuvan materiaalin määrä suurenee ja siten myös uuttuvan materiaalin pinta-ala suurenee. Lisäksi kun näytemäärä on suurempi, kaurajauhon laatuerojen (enemmän/vähemmän lesefraktioita) aiheuttaman epähomogeenisyyden vaikutus pitoisuuksiin ja niiden vaihteluun tasoittuu. Eli kaurajauhosta saadaan silloin suurempi ja sen avenantramidien pitoisuuksia paremmin edustava otanta.

Xie ym. (2017) käyttivät 0,5 g:n kauralesenäytteitä. Näytemääränä 0,5 g ei ole kuitenkaan kovin suuri verrattuna Mattilan ym. (2005) (kaurahiutale, kauralese), Kaurin ym. (2016) (kaurapartikkelit) ja Multarin ym. (2018) (kaurajauho) käyttämiin 5 g:n näytteisiin. Eli näytemäärän suurentamisella edelleen voitaisiin saada suurempia avenantramidien pitoisuuksia.

Tämän tutkimusten tulosten perusteella avenantramidien analysoimisessa kannattaa käyttää 0,5 g:n kaurajauhonäytteitä mieluummin kuin 0,1 g:n kaurajauhonäytteitä. Jatkossa voisi mahdollisesti kokeilla 1 g:n kaurajauhonäytteitä ja tarkastella suurenevatko avenantramidien pitoisuudet entisestään ja miten avenantramidien pitoisuudet vaihtelevat. Lisäksi täytyy huomioda, että tässä työssä avenantramidit määritettiin yhdestä kauratuotteen yksittäispakkauksesta, joten ei voida puhua edustavasta näytteenotosta. Laajempia kauratuotteiden koostumusanalyysyjä varten tarvitaan useita näytteitä useista pakkauksista.

Näytteen ja liuottimen suhde

Tutkimuksessa käytetty näytteen ja liuottimen suhde 1:10 toimi erinomaisesti eikä sitä ole syytä tulevaisuudessakaan muuttaa. Pridal ym. (2018) totesivat näytteen ja liuottimen suhteen 1:10 olleen parempi kuin 1:5 suhteen. Tällöin näytteen määrä oli sopivassa suhteessa liuottimen määrään ja haihdutusaika säilyi lyhyenä. Näytteen ja liuottimen suhteen 1:5 antoi myös marginaalisesti pienemmän vasteen kuin suhde 1:10.

Jauhatusaste

Kaurajauhon partikkelikoon pienentäminen mahdollisti avenantramidien paremman uuttuvuuden. Kun verrattiin toisiinsa suuremman partikkelikoon jauhon ja partikkelikokoon 0,5 mm jauhetun jauhon tuloksia, voitiin todeta, että kun jauhojen partikkelikokoa pienennettiin, avenantramidit uuttuivat paremmin, eli avenantramidien määritetyt pitoisuudet suurenivat (12 %) ja vaihtelu variaatiokertoimen mukaan pieneni huomattavasti. Partikkelikoon pieneminen lisäsi jauhon homogeenisyyttä ja uuttuvan materiaalin pinta-alaa ja lisäsi siten avenantramidien uuttuvuutta. Toisin sanoen avenantramidien analysointi kaurajauhosta edellyttää sitä, että kaurajauhon partikkelikoko on enintään 0,5 mm.

Tämän tutkimuksen tuloksista poiketen Hitayezun ym. (2015) mukaan partikkelikoko ei vaikuttanut avenantramidien pitoisuuksiin. Hitayezu ym. (2015) totesivat, että hienon leseeseen pieni rakeisuus ei lisännyt avenantramidien uuttuvuutta suhteessa keskikarkeaan leseeseen. Hitayezun ym. (2015) tapauksessa on voinut olla kyse pienestä partikkelikoon pienemisestä, joka ei ole lisännyt homogeenisyyttä ja siten uuttuvuutta huomattavasti.

Uuttoajan pidentäminen

Kun kaurajauhon ensimmäinen uutto tasoravistelijassa kesti yön yli, avenantramidien määritetyt pitoisuudet olivat 35 % suurempia 0,1 g:n näytteillä ja 14 % suurempia 0,5 g:n näytteillä kuin perusuutolla (3 x 20 min). Uuttoajan pidentämisellä oli enemmän vaikutusta pienemmän näytemäärän näytteistä (0,1 g) määritettyihin avenantramidien pitoisuuksiin kuin suuremman näytemäärän näytteistä (0,5 g) määritettyihin avenantramidien pitoisuuksiin. Pienen näytemäärän näytteiden pitoisuudet olivat yön yli uuton jälkeen nimittäin suuremmat kuin suuremman näytemäärän näytteiden pitoisuudet (2p: 27,4 µg/g vs. 24,7 µg/g). Pitoisuuksien vaihtelu rinnakkaisten näytteiden välillä oli kuitenkin edelleen suurempaa pienen näytemäärän (0,1 g) näytteiden kohdalla kuin 0,5 g:n näytteiden kohdalla, kun uuttoaikaa oli pidennetty. Kun näytemääränä oli 0,5 g, avenantramidien pitoisuuksien vaihtelu (CV%) suureni keskimäärin, kun uuttoaikaa pidennettiin. Tämä vaihtelun suureneminen johtui mahdollisesti esimerkiksi eroista näytteiden koostumuksessa.

Tulosten perusteella voidaan todeta, että uuttoajan pidentäminen 20 minuutista 15 tuntiin johti suurempiin avenantramidien pitoisuuksiin. Jatkossa voitaisiin kuitenkin määrittää tarkemmin optimaalinen uuttoaika. Nimittäin ero 20 minuutin ja 15 tunnin välillä on melko

suuri ja on mahdollista, että 15 tunnin uutolla saadut pitoisuudet voitaisiin saada myös lyhyemmällä uuttoaajalla.

Pridal ym. (2018) uuttivat avenantramidit kaurajauhosta 20 minuutissa ja Multari ym. (2018) 30 minuutissa. Maliarova ym. (2015) optimoivat kauraleseen avenantramidien uuttoaajan puolestaan 2 tuntiin ja 45 minuuttiin. Myös Hitayezu ym. (2015) käyttivät pidempää uuttoaikaa. He uuttivat avenantramidit kaurajauhosta ja kauraleseestä kahdessa tunnissa. Lisäksi sekä Maliarova ym. (2015) ja Hitayezu ym. (2015) uuttivat avenantramidit kauranäytteistä n. 50 °C:ssa. Uuton aikaisen lämpötilan vaikutusta olisikin mielenkiintoista tutkia jatkossa, koska tässä tutkimuksessa kauratuotteet uutettiin huoneenlämmössä.

Uuttojäännösten analyysi

Uuttojäännösten avenantramidien kvantitoinnissa käytettiin ulkoisen standardin menetelmää. Kuten analysoitaessa uuttojäännöksiä kävi ilmi, osa avenantramideista jää uuttumatta, vaikka näytettä olisi uutettu yön yli. Kuitenkin uuttoaajan lisäys mahdollistaa selvästi avenantramidien suuremman uuttuvuuden. Avenantramidien määritetyt pitoisuudet olivat 31 % pienempiä yön yli uutettujen 0,1 g:n näytteiden uuttojäännöksissä ja 40 % pienempiä yön yli uutettujen 0,5 g:n näytteiden uuttojäännöksissä kuin perusuuton (3 x 20 min) jälkeisissä 0,1 g:n ja 0,5 g:n näytteiden uuttojäännöksissä. Kirjallisuudesta ei löydy juurikaan tietoa uuttojäännösten analysoimisesta ja niihin mahdollisesti jäävistä avenantramideista. Uuttojäännösten analyysien avulla saatiinkin hyödyllistä tietoa erityisesti uuton tehokkuudesta ja uuttojäännöksiin jäävien avenantramidien pitoisuuksista.

Sisäinen standardi

Sisäiseksi standardiksi valittu 2-fenyyli-2,4,6-trihydroksiasetofenoni toimi hyvin sisäisenä standardina. Sisäisen standardin huomattiin kuitenkin reagoivan uuttoliuotuksessa käytetyn fosfaattipuskurin kanssa. Tällöin sisäisen standardin pitoisuus pieneni huomattavasti. Tästä syystä fosfaattipuskurin käyttö uuttoliuotuksessa lopetettiin, koska tutkimuksessa haluttiin käyttää sisäisen standardin menetelmää kvantitoinnissa. Aikaisemman kirjallisuuden perusteella kvantitoinnissa on käytetty ulkoisen standardin menetelmää, mutta myös esimerkiksi Pridal ym. (2018) totesivat 2-fenyyli-2,4,6-trihydroksiasetofenonin toimivan hyväksyttävästi. Kvantitoinnin tukena käytettiin kuitenkin myös ulkoisen standardin menetelmää analysoitaessa uuttojäännöksiä.

Haihdutin

Tutkimuksessa käytettiin tyypihaihduttajaa supernatanttien haihduttamiseen. Menetelmän kehitysvaiheessa tyypihaihdutin oli erityisen hyvä valinta siitä syystä, että siinä mahtui haihduttamaan useita näytteitä samanaikaisesti. Yhden näytteen kohdalla haihdutusaika oli pitkäkö, mutta suhteutettuna samanaikaisesti haihdutettavien määrään haihdutusaika oli lopulta melko lyhyt.

Menetelmän parannusvaiheessa, kun näytteiden lukumäärä on pienempi kuin tämän tutkimuksen optimoinnissa ja sovellusosassa, voitaisiin mahdollisesti kokeilla myös esimerkiksi sekoittavaa tyhjiöhaihdutinta, joka Pridalin ym. (2018) mukaan johti kolme kertaa suurempiin avenantramidien määritettyihin pitoisuuksiin kuin kiertoaihdutin.

Käytettäessä kiertoaihdutinta haihtuminen on mahdollisesti voinut olla epätasaisempaa kuin käytettäessä tyhjiöaihdutinta. Avenantramidit saattavat olla myös alttiimpia hapettumiselle kiertoaihduttimessa kuin tyhjiöaihduttimessa. Myös ero haihdutusajassa on voinut vaikuttaa pitoisuuksien eroihin. Lisäksi on mahdollista, että tyhjiöaihduttimella suurempi osa avenantramideista on saatu talteen haihduttamisen jälkeen kuin kiertoaihduttimella. Tyhjiöaihduttimen etuna on myös se, että siinä on tyypihaihduttimen tapaan mahdollista haihduttaa useita näytteitä samanaikaisesti toisin kuin kiertoaihduttimessa, jossa voi haihduttaa vain yhtä näytettä kerralla.

Kauranäytteet

Tässä työssä kehitetty UHPLC-menetelmä soveltuu jatkossa yleisimpien avenantramidimuotojen 2c, 2d, ja 2p määrittämiseen kaurasta ja erilaisista kauratuotteista. Optimoitu uutto osoittautui toimivaksi ja toistettavaksi erityisesti jo valmiiksi homogeenisille ja prosessoiduille näytteille. Tässä työssä kuitenkin todettiin uuttomenetelmän optimoinnin yhteydessä, että avenantramidien pitoisuuksiin ja pitoisuuksien vaihtelun suuruuteen vaikuttivat näytemäärän suuruus, näytteiden homogeenisyys ja uutto aika.

Kaurajauhonäytteiden avenantramidien pitoisuuksien välillä oli suurta vaihtelua. Näytteenä käytettiin suuremman partikkelikoon täysjyväkaurajauhoa, joka oli selvästi epähomogeenistä. Näytemäärä 0,1 g oli myös selkeästi liian pieni yhdistettynä

epähomogeeniseen näytteeseen. Tulosten parantamiseksi näyte tuli jauhaa homogeenisemmaksi ja näytemäärää tuli suurentaa 0,5 g:aan. Tällä tavoin voitiin pienentää pitoisuuksien vaihtelua ja saatiin samansuuruisia tuloksia.

Kauralesenäytteiden variaatiokertoimien suuruuden perusteella voidaan todeta, että kauralesekään ei ollut tarpeeksi homogeenista. Vaikka kauralese oli jauhettu partikkelikokoon 0,5 mm, eli partikkelikokoa oli pienennetty ja koostumusta tehty homogeenisemmaksi, vaihtelua esiintyi avenantramidien pitoisuuksissa. Tulevaisuudessa tulisikin analysoida kauralesenäytteitä suuremmalla näytemäärällä (0,1 g vs. 0,5 g), kuten tehtiin täysjyväkaurajauhon kohdalla. Suurempi näytemäärä pienentää kauraleseessä esiintyvän vaihtelun vaikutusta avenantramidien pitoisuuksiin.

Kaurajogurtissa avenantramidien pitoisuudet eivät vaihdelleet suuresti rinnakkaisnäytteiden välillä. Vaihtelun vähäisyys johtui erityisesti kaurajogurtin suuresta homogeenisyydestä, jonka prosessointi oli mahdollistanut. Näytemäärä (0,5 g) oli myös ilmeisen sopiva, jotta tuloksista saatiin yhdenmukaisia.

Tulosten perusteella näytemäärä (0,5 g) oli sopiva kaurajuomalle. Avenantramideja analysoitiin kuitenkin vain kolmesta rinnakkaisnäytteestä. Pitoisuuksien vaihtelun suuruutta ei siis voi täysin verrata esimerkiksi kaurajogurtilla esiintyvään vaihteluun, koska näytteitä oli paljon vähemmän. Kuitenkin saatujen kaurajuoman tulosten perusteella voidaan todeta, että kaurajuoma oli hyvin homogeenista ja se edesauttoi yhdenmukaisten tulosten saavuttamista.

Nyhtökaurassa avenantramidien pitoisuudet vaihtelivat hieman rinnakkaisnäytteiden välillä. Nyhtökaura jauhettiin itse tasaiseksi. Nyhtökaura on tuotteena kuitenkin hyvin epähomogeenista, joten avenantramidien pitoisuuksien vaihtelua voi selittää ainakin osittain tuotteen koostumus. Luultavasti myös näytemäärän suurentaminen 0,2 g:sta esimerkiksi 0,5 g:aan pienentäisi pitoisuuksien vaihtelua.

Kaurajauhiksen variaatiokertoimet olivat pieniä, eli saatujen rinnakkaisnäytteiden tulokset olivat hyvin samansuuruisia keskenään. Kaurajauhis jauhettiin myös itse, mutta se oli jo lähtökohtaisesti homogeenisempaa kuin esimerkiksi nyhtökaura. Kaurajauhikselle näytemäärä 0,2 g on ilmeisen sopiva antamaan tasalaatuisia tuloksia.

4.2 UHPLC-ANALYYSIN OPTIMOINTI

Avenantramidien piikit erottuivat toisistaan hyvin ja piikit olivat symmetrisiä. Muodot 2p ja 2f eluoituivat kuitenkin peräkkäin, mistä syystä niiden piikit olivat hyvin lähellä toisiaan. Sisäisen standardin piikki erottui selvästi avenantramidien jälkeen. Valituilla ajoliuoksilla ja gradientilla saavutettiin suurin resoluutio.

Fosfaattipuskurin kanssa avenantramidien piikit olivat keskimäärin hieman korkeampia kuin ilman puskuria. Avenantramidien huomattiin myös eluoituvan hieman aikaisemmin fosfaattipuskurin kanssa kuin ilman sitä. Avenantramidien eluoituminen ja piikkien pinta-alat olivat kuitenkin hyvin samanlaisia puskurin kanssa ja ilman sitä. Fosfaattipuskurin vaikutus avenantramidien piikkien korkeuteen ja retentioaikoihin johtui luultavasti pH-arvosta. Fosfaattipuskurin avulla pH vakioitiin 2,8:aan ja se vastusti pH:n muutoksia analysoitaessa avenantramideja.

Kolonnin vaikutus

Tutkimuksessa käytetty C18-kolonne (1,8 μm , 2,1 x 150 mm) toimi hyvin ja sillä saatiin hyvin erotetuksi päämuodot ja muut muodot. De Bruijn ym. (2018) käyttivät samaa C18-kolonna kuin tässä tutkimuksessa UHPLC-laitteistolla. Kirjallisuuskatsauksen perusteella tutkimuksissa on käytetty pääasiassa erikokoisia C18-käänteisfaasikolonneja (1,7–5 μm , 50 mm x 3,2 mm–150 mm x 4,6 mm).

Ajoliuokset

Tässä tutkimuksessa avenantramidit erottuivat parhaiten, kun ajoliuoksina käytettiin 0,5 % muurahaishappoa vedessä (A) ja 0,5 % muurahaishappoa asetonitriilissä (B). De Bruijn ym. (2018) tutkimuksessa käytettiin UHPLC-laitteistoa ja ajoliuoksina 0,1 % muurahaishappoa vedessä (A) ja 0,1 % muurahaishappoa metanolissa (B). Tässä tutkimuksessa avenantramidien todettiin kuitenkin eluoituvan hieman myöhemmin, kun käytettiin 0,1 % muurahaishappoa vedessä ja 0,1 % muurahaishappoa asetonitriilissä, kuin 0,5-prosenttisilla liuoksilla.

Kuitenkin kirjallisuudesta löytyy useita muita ajoliuosyhdistelmiä. Liuotin A oli useimmiten 0,1 % muurahaishappoa vedessä (Kaur ym. 2016, Pridal ym. 2018, Xie ym. 2017, De Bruijn

ym. 2018). Mattila ym. (2005) ja Multari ym. (2018) käyttivät puolestaan 0,05 M fosfaattipuskuria (pH 2,4). Pridal ym. (2018), Xie ym. (2017) ja De Bruijn ym. (2018) käyttivät toisena liikkuvana faasina (liuotin B) 0,1 % muurahaishappoa metanolissa. Tutkimuksissa esiintyi myös pelkkä metanoli (Mattila ym. 2005, Multari ym. 2018) tai asetonitriili (Bratt ym. 2003, Kaur ym. 2016).

Gradientti, kolonnin lämpötila ja virtausnopeus

Gradientti, jolla saavutettiin paras avenantramidien erottuminen kromatografisten parametrien perusteella oli: 0–1 min (95:5); 1–8 min (50:50); 8–10 min (50:50); 10–12 min (20:80); ja 14–16 min (95:5). Kirjallisuuden perusteella valittiin analyysin lämpötila 40 °C (Pridal ym. 2018) ja virtausnopeus 0,3 ml/min (De Bruijn ym. 2018). Ne todettiin erittäin toimiviksi.

Tutkimuksessa käytetty gradientti valittiin, koska avenantramidien piikit erottuivat toisistaan hyvin ja piikit olivat symmetrisiä. Lisäksi sisäinen standardi eluoitui tutkittavien yhdisteiden jälkeen sopivassa paikassa eikä siis peittänyt muita yhdisteitä. Ajoaika oli lisäksi huomattavasti lyhyempi kuin HPLC-menetelmissä (16 min vs. 56 min (Mattila ym. 2005)).

Validointi

Kehitetyllä menetelmällä saatiin hyvin erotetuksi yleisimmät avenantramidimuodot 2c, 2f ja 2p ja muut avenantramidimuodot, kuten 2fa, 2pa, 5p, 5f ja 3f, jotka varmistettiin massaspektrometrillä. Muita muotoja voi jatkossa kvantitoida 2c-, 2f- ja 2p-muotojen standardisuorilta. UHPLC-laitteen vaste oli lineaarinen testatuilla pitoisuusalueilla kaikille kolmelle avenantramidille. Standardisuorien korrelaatiokertoimien neliöt olivat pitoisuusalueella 0,1–5 ng/μl yli 0,998, jota pidetään hyvän tuloksen raja-arvona. Toistotarkkuutta tutkittaessa avenantramidien pitoisuuksien vaihtelu oli pientä. Pieni vaihtelu johtui luultavasti kauralesenäytteiden pitoisuuksissa olevista eroista, joihin vaikutti erityisesti näytteiden homogeenisyys. Tutkimuksessa kehitettiin käyttökelpoinen UHPLC-menetelmä, jolla saatiin toistettavia tuloksia.

Tässä työssä avenantramidien saannot olivat 99–117,4 % suurella lisäyستasolla (20 μg/g) ja 53,4–69,2 % pienemmällä lisäyستasolla (5 μg/g). Pridalin ym. (2018) tulokset saannolle olivat erilaisia tämän tutkimusten tulosten kanssa: 68–86 % lisäyستasolla 100 μg/g ja 56–69

% lisäystrasolla 10 µg/g. Tässä tutkimuksessa saatiin suuremmat saannot avenantramideille pienemmällä lisäystrasolla kuin Pridal ym. (2018). He saivat suurimmat saannot muodolle 2c ja pienimmät saannot 2f-muodolle, kun taas tässä tutkimuksessa suurimmat saannot saatiin 2p-muodolle ja pienimmät saannot 2c-muodolle. Pridalin ym. (2018) saantojen vaihteluväli 54–104 % oli kuitenkin samansuuruinen kuin tässä tutkimuksessa (53,4–117,4 %).

Tässä työssä avenantramidien määrittämisrajat olivat välillä 151–164 ng/ml. Jastrebova ym. (2006) saivat määrittämisrajoiksi puolestaan 100 ng/ml (2p), 100 ng/ml (2f) ja 400 ng/ml (2c) käyttäessään HPLC-menetelmää. Jastrebovan ym. (2006) saamiin LOD- ja LOQ-arvoihin verrattuna tämän tutkimuksen avenantramidien 2f ja 2p arvot olivat suurempia, mutta pienempiä kuin 2c:n arvot. Tässä tutkimuksessa saatujen LOD- ja LOQ-arvojen ja Jastrebovan ym. (2006) saamien vastaavien arvojen välisiä eroja voivat selittää esimerkiksi erilaiset menetelmät (HPLC vs. UHPLC).

4.3 AVENANTRAMIDIEN MS-ANALYYSI

LC-MS -menetelmällä pystyttiin varmistamaan kauranäytteistä yleisimpien avenantramidimuotojen lisäksi myös muita muotoja, kuten 2f_d, 2p_d, 5p, 5f ja 3f. MS-laitteella tehdyn varmistuksen jälkeen muita muotoja voidaan jatkossa tunnistaa ja kvantitoida kehitetyllä UPLC-analyysillä. Avenantramidien 2f_d ja 2p_d pitoisuudet kaurajauholla vaihtelivat vähemmän (2f_d: 11,2 % vs. 5,9 %; 2p_d: 10,4 % vs. 8,1 %), kun näyttemäärä suureni (0,1 g vs. 0,5 g), kuten aikaisemmin tarkasteltujen muotojen kohdalla. Avenantramidien 2f_d ja 2p_d pitoisuuksien vaihtelu oli pientä (2f_d: 3,6 %; 2p_d: 3,3 %) (suurta, jos CV %>30, Keinänen 2010) myös kaurajauhiksella.

Pridal ym. (2018) olivat analysoineet avenantramidien 2f_d- ja 2p_d-muodot muun muassa kaurajauhosta, -leseestä ja -vellistä. De Bruijn ym. (2018) analysoivat UHPLC-menetelmällä kauranjyvistä ja idätetyistä jyvistä useita erilaisia muotoja, kuten myös tässä tutkimuksessa analysoidut 2f_d-, 2p_d-, 5p-, 5f- ja 3f-muodot. He arvioivat kauranjyvien sisältävän kokonaisuudessaan 9,6 µmol avenantramideja 100 g kuivapainoa kohden eli noin 30 µg/g. Tästä >70 % koostui yleisimmistä kolmesta muodosta 2c, 2f ja 2p. Idätyksen jälkeen avenantramidien kokonaispitoisuus suureni 25-kertaiseksi ja kolmen yleisimmän muodon osuus kokonaispitoisuudesta oli <20 %. Idätetyissä jyvissä suurin osa avenantramideista oli pitkäketjuisia muotoja, joiden pitoisuutta idätys selvästi lisäsi.

De Bruijn ym. (2018) havainnon pohjalta voidaan arvioida, että avenantramidien kokonaismääräksi tässä tutkimuksessa saataisiin noin 30,4 µg/g, kun avenantramidit 2c, 2f ja 2p ovat 70 % kaikista muodoista (21,3 µg/g). Tällöin 2f_d- ja 2p_d-muodot muodostaisivat 9 % kaikista muodoista (2,7 µg/g). Muut avenantramidimuodot ovat siten noin 21 % avenantramidien kokonaismäärästä eli noin 6,4 µg/g.

Tämän tutkimuksen MS-analyysissä käytettiin negatiivista ionisaatiota, koska sillä saatiin avenantramideille suuremmat vasteet kuin positiivisella ionisaatiolla. Kuitenkaan positiivisen ja negatiivisen ionisaation välillä ei ollut suurta eroa. Kuitenkin esimerkiksi Xie ym. (2017), Hitayezu ym. (2015) ja Jastrebova ym. (2006) käyttivät MS-analyysissä positiivista ionisaatiota, koska he saivat avenantramideille 2c, 2f ja 2p vahvemmat signaalit kuin negatiivisella ionisaatiolla. Kun taas Antonini ym. (2017) käyttivät ESI:ä myös negatiivisella ionisaatiolla. Käytetyn ionisaation (positiivinen vs. negatiivinen) vaihtelu kertoo luultavasti siitä, että erot niiden välillä ovat hyvin pieniä.

4.4 AVENANTRAMIDIT KAURATUOTTEISSA

Kokonaisavenantramidipitoisuus

Kehitetyllä UHPLC-menetelmällä tutkittiin tiettyjen kauranäytteiden avenantramidipitoisuudet. Avenantramidien kokonaispitoisuus vaihteli välillä 3–41,3 µg/g tuorepainoa kohden. Avenantramideja analysoitiin ensimmäistä kertaa kaurajogurtista, kaurajuomasta ja nyhtökaurasta ja kaurajauhiksesta. Tämän takia niistä ei löydy aikaisempia tutkimustuloksia.

Tulosten perusteella voidaan todeta, että avenantramideja oli eniten kauraleseessä ja vähiten kaurajogurtissa. Kauraleseessä oli avenantramideja noin kolme kertaa enemmän kuin kaurajauhossa (41,3 µg/g vs. 15,7 µg/g). Kaurajuomassa oli 1,5 kertaa enemmän avenantramideja kuin kaurajogurtissa (4,5 µg/g vs. 3 µg/g). Kaurajauhiksessa oli puolestaan noin kaksi kertaa enemmän avenantramideja kuin nyhtökaurassa (19,7 µg/g vs. 9,2 µg/g). Avenantramidien pitoisuudet kaurajuomassa ja kaurajogurtissa olivat odotetusti moninkertaisesti pienempiä täysjyväkaurajauhoon (0,1 g, 70–80 %) ja kauraleseeseen (90 %) verrattuna. Tulosten perusteella voidaan todeta, että avenantramidit sijaitsevat pääosin leserikastetuissa jauhatusfraktioissa ja niiden pitoisuudet suurenevät kaurapitoisuuden suurentuessa. Tämän totesivat myös Pridal ym. (2018) ja Kaur ym. (2016).

Kauratuotteiden avenantramidipitoisuuksista ei ole juurikaan aikaisempaa tutkimustietoa. Eniten raportoituja tuloksia löytyy kaurajauhoille, -leseille ja -hiutaleille. Ainoastaan Pridalin ym. (2018) tutkimuksessa oli analysoitu laajemmin myös muita kauratuotteita, kuten muroja, leipää, keksejä ja pastaa. Kaurajuomaa ja kaurajogurtia vastaavia tuotteita ei ollut kuitenkaan analysoitu. Lähimpänä näiden tuotteiden koostumusta oli kauravelli (taulukko 26), jossa Pridalin ym. (2018) mukaan oli avenantramideja 29 µg/g.

Taulukko 26. Kirjallisuusarvot ja tämän tutkimuksen tulokset avenantramidien (2c, 2f, 2p, 2p_d ja 2f_d) pitoisuuksille (µg/g) kauratuotteissa.

Näyte	Pitoisuus (µg/g)						
	2p	2f	2c	Yhteensä	2p _d	2f _d	Yhteensä
Täysjyväkaurajauho	6 ¹ ; 8,6 ² ;4,7 ³	9 ¹ ; 9 ² ;7,5 ³	11 ¹ ; 9 ² ; 9,1 ³	26 ¹ ; 26,6 ² ; 21,3 ³	3 ¹ ; 1,3 ³	4 ¹ ; 1,4 ³	33 ¹ ; 24 ³
Kauralese	11 ¹ ; 4,1 ² ; 14,6 ⁴	17 ¹ ; 4,3 ² ; 18,3 ⁴	12 ¹ ; 4,4 ² ; 8,4 ⁴	40 ¹ ; 12,8 ² ; 41,3 ⁴	4 ¹	5 ¹	49 ¹
Kauravelli¹	8	9	12	29	1	3	33
Kaurajuoma (0,5 g, N=3)³	1,0	2,5	1,0	4,5			
Kaurajogurtti (0,5 g, N=12)³	0,9	1,4	0,7	3			

¹Pridal ym. (2018)

²Mattila ym. (2005)

³Tämä tutkimus, kaurajauho (0,5 g, 0,5 mm, N=4)

⁴Tämä tutkimus kauralese (0,1 g, N=6)

Kuten tässä tutkimuksessa myös Mattilan ym. (2005), Pridalin ym. (2018), Chenin ym. (2018) ja Hitayezun ym. (2015) mukaan avenantramideja oli enemmän lesefraktiossa kuin täysjyväkaurassa. Mattilan ym. (2005) (26,6 µg/g) ja Pridalin ym. (2018) (26 µg/g) tulokset kaurajauholle olivat melko lähellä toisiaan. Mattilan ym. (2005) avenantramidien määritetyt pitoisuudet (12,8 µg/g) kauraleseessä olivat kuitenkin hyvin pieniä verrattuna Pridalin ym. (2018) tuloksiin (40 µg/g) sekä tämän tutkimuksen tuloksiin (41,3 µg/g).

Tässä tutkimuksessa kaurajauholle (näytemääränä 0,5 g) saadut avenantramidien pitoisuudet olivat pienempiä (20 %) kirjallisuusarvoihin verrattuna. Kauraleseen pitoisuudet olivat 3 % suurempia kuin Pridalin ym. (2018) ja 69 % suurempia kuin Mattilan ym. (2005) saamat tulokset. Kaurajuomasta ja kaurajogurtista analysoitiin paljon vähemmän (85–90 %) avenantramideja kuin kauravellistä. Tätä eroa voidaan selittää yksinkertaisesti tuotteiden koostumuksen eroilla. Kauravellin kaurapitoisuus on luultavasti huomattavasti suurempi kuin kaurajuoman 10 % tai kaurajogurtin 8,5 %. Avenantramideja 2f_d ja 2p_d oli

kaurajauhossa Pridalin ym. (2018) mukaan 57–65 % enemmän tässä tutkimuksessa saatuihin tuloksiin verrattuna.

Avenantramidien eri muodot, niiden esiintyvyys ja suhteet

Tässä työssä määritetyt kauratuotteiden avenantramidien pitoisuudet vaihtelivat välillä 0,9–9,1 (2c), 1,4–18,3 (2f) ja 0,7–14,6 (2p). Tutkituista kauranäytteistä 2c-muotoa oli eniten kaurajauhossa (näytemääränä 0,5 g) ja vähiten sitä oli kaurajogurtissa. 2f-muotoa oli eniten kauraleseessä ja vähiten kaurajogurtissa. 2p-muotoa oli puolestaan eniten kauraleseessä ja vähiten kaurajogurtissa.

Tämän tutkimuksen tulosten (taulukko 23) perusteella voidaan todeta, että kaurajauhossa avenantramidien eri muotojen pitoisuudet pienenevät seuraavasti: 2c (6,6 µg/g) > 2f (5,5 µg/g) > 2p (3,6 µg/g). Kauraleseessä 2f-muotoa oli enemmän kuin muita muotoja (18,3 µg/g). Tämän totesivat myös Pridal ym. (2018). Kuitenkin myös 2p-muotoa oli reilusti enemmän (14,6 µg/g) 2c-muotoon verrattuna (8,4 µg/g). Kaurajuomassa ja kaurajogurtissa myös muotoa 2f oli eniten (2,5 µg/g; 1,4 µg/g) ja 2c- ja 2p-muotoja oli lähes saman verran (1,0 µg/g; 0,9 µg/g vs. 1,0 µg/g; 0,7 µg/g).

Mattilan ym. (2005) ja Pridalin ym. (2018) mukaan täysjyväkaurajauhossa esiintyi eniten 2c-muotoa ja vähiten 2p-muotoa. Pitoisuudet olivat kuitenkin kaikkien muotojen kesken melko lähellä toisiaan. Kauraleseessä oli Pridalin ym. (2018) mukaan runsaasti enemmän 2f-muotoa 2c- ja 2p-muotoihin verrattuna, joita oli lähes saman verran. Pridalin ym. (2018) mukaan kauravellissä esiintyi eniten 2c-muotoa ja vähiten 2p-muotoa.

Määritetyt avenantramidien pitoisuudet vaihtelevat eri tutkimusten välillä. Eroja pitoisuuksissa voivat aiheuttaa niin kauralajike, kauratuotteen käsittely, tutkittavan näytteen homogeenisyys, uutto- ja analyysimenetelmien erot kuin erot kvantitoinnissa. Vaihtelua tuloksissa aiheuttaa luultavasti myös erot siinä, mistä kohtaa jyvää tarkalleen ottaen kauratuote on otettu. Avenantramidien pitoisuudet vaihtelevat nimittäin suuresti kauranjyvän sisällä.

Pridalin ym. (2018) tutkimuksessa käytettiin 0,1 g:n kauranäytteitä. Mattilan ym. (2005) tutkimuksessa käytettiin 5 g:n kauranäytteitä. Erot näytemäärissä voivat jo vaikuttaa suuresti

havaittaviin eroihin avenantramidien pitoisuuksissa. Käytössä olleet uuttoliuottimet voivat vaikuttaa avenantramidien uuttuvuuteen. Haihduttimella voi myös olla vaikutusta. Pridal ym. (2018) ja Mattila ym. (2005) käyttivät HPLC-laitteistoa eivätkä UHPLC-laitteistoa niin kuin tässä tutkimuksessa. Täten käytetty gradientti, ajoliuokset ja kolonni voivat vaikuttaa avenantramidien eluoitumiseen ja siten niiden pitoisuuksiin.

Prosessoinnin vaikutus

Tarkasteltaessa eri muotojen prosentuaalisia osuuksia eri kauratuotteissa ja verrattaessa prosessoidumpia kauratuotteita (juomaa, jogurttia, nyhtökauraa ja kaurajauhistä) kaurajauhoon tultiin siihen lopputulokseen, että 2c-muodon pitoisuus pieneni (30–49 %), 2f-muodon pitoisuus suureni (22–38 %) ja 2p-muotoa oli keskimäärin saman verran (0–12 %) kaurajauhoon ja prosessoidumpien kauranäytteiden välillä (taulukko 27). Prosessointi pienensi (2c) ja suurensi (2f) tiettyjen muotojen pitoisuuksia huomattavasti. Pitoisuuksiin voi kuitenkin vaikuttaa suuresti käytetty kauranjyvän osa.

Dimberg ym. (1996) havaitsivat avenantramidien 2c ja 2f pitoisuuksien pienenevän vain vähän kuumennuksen aikana. 2f-muodon on todettu olevan melko lämpöstabiili antioksidantti kaurassa ja se voi lisätä lämpökäsiteltyjen kauratuotteiden oksidatiivista stabiilisuutta. Avenantramidi 2p todettiin labiilimmaksi kuin 2c- ja 2f-muodot. Myös Bryngelssonin ym. (2002) mukaan kaurahiutaleissa esiintyi käsittelemättömiin kauranjyviin verrattuna vähemmän avenantramidi 2p:tä. Prosessointi ei vaikuttanut 2c:n ja 2f:n pitoisuuksiin.

Taulukko 27. Avenantramidien 2c, 2f ja 2p suhteelliset osuudet (%) eri kauratuotteissa.

Näyte	2c	2f	2p
kaurajauho¹ (N=20)	43	35	22
kauralese (N=6)	20	44	35
kaurajuoma (N=3)	22	56	22
kaurajogurtti (N=12)	30	47	23
nyhtökaura (N=4)	26	50	24
kaurajauhis (N=4)	30	45	25

¹keskiarvo: 0,1 g ja suurempi partikkelikoko (N=12), 0,1 g ja jauhettu partikkelikokoon 0,5 mm (N=4) ja 0,5 g ja jauhettu partikkelikokoon 0,5 mm (N=4).

Tutkitut prosessoidut näytteet (kaurajuoma, kaurajogurtti, nyhtökaura ja kaurajauhis) sisälsivät enemmän (50 %) avenantramideja kuin niiden olisi pitänyt kaurapitoisuuden perusteella (taulukko 28). Myös Dimberg ym. (2001) huomasivat vapaiden avenantramidien pitoisuuksien suurentuvan prosessoinnin aikana, mitä he selittivät mahdollisella

avenantramidien *de novo* -synteesillä, sitoutuneiden muotojen vapautumisella tai uuttuvuuden lisääntymisellä. Sitä vastoin Bryngelsson ym. (2002) eivät havainneet prosessoinnin suurentavan määritettyjä pitoisuuksia, vaan he totesivat, että vahva lineaarinen suhde kaura raaka-aineiden määrän ja avenantramidien välillä kertoo siitä, että kaupalliset prosessointimenetelmät eivät vaikuta merkittävästi pitoisuuksiin.

Taulukko 28. Prosessoitujen kauranäytteiden avenantramidien määritetyt pitoisuudet (µg/g) ja laskennalliset pitoisuudet (µg/g) sekä avenantramidien määritettyjen ja laskennallisten pitoisuuksien prosentuaalinen ero (%).

Näyte	Pitoisuus (µg/g) ¹			
	2c	2f	2p	Yhteensä
kaurajuoma (N=3)	1 ¹ ;0,9 ² (10 %)	2,5;0,8 (68 %)	1;0,5 (50 %)	4,5;2,2 (51 %)
kaurajogurtti (N=12)	0,9;0,8 (11 %)	1,4;0,6 (57 %)	0,7;0,4 (43 %)	3;1,8 (40 %)
nyhtökaura (N=4)	2,4;1,9 (21 %)	4,6;1,6 (65 %)	2,2;1 (55 %)	9,2;4,5 (51 %)
kaurajauhis (N=4)	5,9;3,7 (37 %)	8,9;3,1 (65 %)	4,9;1,9 (61 %)	19,7;8,7 (56 %)

¹määritetty pitoisuus; laskennallinen pitoisuus (määritetyn ja laskennallisen pitoisuuden prosentuaalinen ero)

Laskennalliset tulokset saatiin pakkausmerkintöjen kaurapitoisuuksien ja täysjyväkaurajauhojen avenantramidien pitoisuuksien avulla. Pitoisuudet voivat olla suuremmat prosessoinnin vaikutuksesta, mutta myös jos tuotteissa on käytetty enemmän esimerkiksi lesefraktioita.

5. PÄÄTELMÄT

Tutkimuksessa kehitettiin kauran avenantramidien analyysimenetelmä, joka validointiin. Olosuhteet optimoitiin uutolle ja UHPLC-analyysille. Tähän sisältyi muun muassa uuton uuttoliuottimen, uuttoliuottimen määrän, näytemäärän ja uuttokertojen määrän sekä UHPLC-analyysin ajoliuksien, virtausnopeuden, kolonnin lämpötilan, gradientin ja ajoaikojen optimointi. Menetelmän sovelluksena avenantramideja tutkittiin erilaisista suomalaisista kauratuotteista. Kaurasta ja kauratuotteista tunnistettiin, analysoitiin ja kvantitoitiin avenantramidien yleisimpiä 2c-, 2f- ja 2p-muotoja. Lisäksi tunnistettiin ja kvantitoitiin myös muita avenantramidien muotoja, kuten 2f_d ja 2p_d, käyttäen LC-MS -tekniikkaa.

Tässä työssä todettiin uuttomenetelmän optimoinnin yhteydessä, että avenantramidien pitoisuuksiin ja pitoisuuksien vaihtelun suuruuteen vaikuttivat näytemäärän suuruus, näytteiden homogeenisyys ja uutto aika. Erityisesti kaurajauhon kohdalla käytettäessä 0,5 g:n näytemäärää saanto oli suurempi ja toistettavuus parempi kuin käytettäessä pienempää 0,1

g:n näytemäärää. Näytteen ja liuottimen suhde 1:10 toimi erinomaisesti ja uuttoliuottimena etanoli:vesi 80:20 osoittautui tehokkaammaksi kuin testattu etanoli:vesi fosfaattipuskurin kanssa pH 2,8:ssa. Kaurajauhon partikkelikoon pienentäminen ja yön yli uutto mahdollistivat avenantramidien paremman uuttuvuuden ja sitä kautta paremman saannon kuin lyhyt uutto suuremman partikkelikoon näytteelle.

Avenantramidien analysointiin kehitetty UHPLC-menetelmä oli toistettava ja nopea ja soveltui hyvin avenantramidien eri muotojen erottamiseen ja kvantitointiin. UHPLC-laitteiston toistotarkkuus oli hyväksyttävä, ja UHPLC-laitteen vaste oli lineaarinen testatuilla pitoisuusalueilla kaikille kolmelle avenantramidille. Lisäksi UHPLC-MS -tekniikalla pystyttiin varmentamaan kauranäytteistä tärkeimmät muodot 2c, 2f ja 2p. UHPLC-MS:n avulla saatiin tunnistettua ja selvitettyä retentioajat muillekin muodoille, kuten 2f_d- ja 2p_d-muodoille.

Vaikka kehitetty uuttomenetelmä ja kvantitointiin käytetty UHPLC-menetelmä osoittautuivat toimiviksi avenantramidien tutkimiseen kauranäytteistä, voitaisiin tulevaisuudessa kiinnittää vielä huomio muutamiin kohtiin näytteen uutossa, jotta uuttovaihe olisi mahdollisimman tehokas ja toistettava. Erityisesti jauho- ja lesenäytteitä analysoitaessa voitaisiin varmistua näytteen homogeenisyydestä sekä käyttää pidempää uuttoaikaa kuin nyt käytettiin.

Tässä tutkimuksessa kehitettyä avenantramidien analyysimenetelmää voidaan hyödyntää tulevaisuudessa kauratutkimuksissa. Lisäksi työssä määritetyt kauratuotteiden avenantramidipitoisuudet ja eri muotojen esiintyvyys niissä antavat hyödyllistä esitietoa mahdollisille laajamittaisille jatkossa toteutettaville kauratutkimuksille.

6. LÄHDELUETTELO

- Antonini E, Diamantini G, Ninfali P. 2017. The effect of mechanical processing on avenanthramide and phenol levels in two organically grown Italian oat cultivars. *J Food Sci Technol* 54(8):2279–2287.
- Bratt K, Sunnerheim K, Bryngelsson S, Fagerlund A, Engman L, Andersson RE, Dimberg L.H. 2003. Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and structure-antioxidant activity relationships. *J. Agric. Food Chem* 51 (3):594–600.
- Bryngelsson S, Dimberg LH, Kamal-Eldin A. 2002. Effects of commercial processing on levels of antioxidants in oats (*Avena sativa* L.). *J Agric Food Chem* 50(7):1890–6.
- Chen C, Wang L, Wang R, Luo X, Li Y, Li J, Li Y, Chen Z. 2018. Phenolic Contents, Cellular Antioxidant Activity and Antiproliferative Capacity of Different Varieties of Oats. *Food Chem* 239:260–267.
- Collins FW. 1989. Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 37:60–66.
- Collins FW, Mullin WJ. 1988. High-performance liquid chromatographic determination of avenanthramides, n-aroylanthranilic acid alkaloids from oats. *Journal of Chromatography A* 445:363–370.
- De Bruijn WJC, Van Dinteren S, Gruppen H, Vincken JP. 2018. Mass spectrometric characterisation of avenanthramides and enhancing their production by germination of oat (*Avena sativa* L.). *Food chemistry* 277(30):682–690.
- Dimberg LH, Sunnerheim K, Sundberg B, Walsh K. 2001. Stability of oat avenanthramides. *Cereal Chemistry* 78(3):278–281.
- Dimberg LH, Molteberg EL, Solheim R, Frølich W. 1996. Variation in oat groats due to variety, storage and heat treatment. I: Phenolic compounds. *Journal of Cereal Science* 24(3):263–272.
- FDA. Center for Drug Evaluation and Research. 1994. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. Saatavilla: <https://www.fda.gov/media/75643/download>. Tulostettu: 10.10.2019.
- FoodDB. 2019. Avenantramidit 2c, 2f ja 2p. Saatavilla: <http://foodb.ca>. Tulostettu: 26.3.2019.
- Hitayezu R, Baakdah MM, Kinnin J, Henderson K, Tsopmo A. 2015. Antioxidant activity, avenanthramide and phenolic acid contents of oat milling fractions. *Journal of Cereal Science* 63:35–40.
- Häsä J. 2015. Suoran sovittaminen pistejoukkoon. Saatavilla: https://www.cs.helsinki.fi/u/jhasa/kurssit/-lm1_kesa16/neliosumma.pdf. Tulostettu: 13.06.2019.
- Jastrebova J, Skoglund M, Nilsson J, Dimberg L.H. 2006. Selective and sensitive LC-MS determination of avenanthramides in oats. *Chromatographia* 63(9–10):419–423.
- Kaur J, Whitson A, Ashton J, Katopo L, Kasapis S. 2016. Effect of ultra-high temperature processing and storage conditions on phenolic acid, avenanthramide, free fatty acid and volatile profiles from Australian oat grains. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 15:21–29.
- Keinänen K. 2010. Haaga-Helia. Luentokooste. Aineiston esittämisestä ja luokittelemisesta. Saatavilla: myy.haaga-helia.fi. Tulostettu: 01.10.2019.
- Maliarova M, Mrazova V, Havrlentova M, Sokol J. 2015. Optimization of Parameters for Extraction of Avenanthramides from Oat (*Avena sativa* L.) Grain Using Response Surface Methodology (RSM). *J. Braz. Chem. Soc.* 26(11):2369–2378.
- Mattila P, Pihlava JM, Hellström J. 2005. Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(21):8290–8295.
- Meydani M. 2014. Avenanthramides, Unique Polyphenols of Oats with Potential Health Effects. Teoksessa: *Oats Nutrition and Technology*. Yi Fang Chu. John Wiley & Sons, Ltd. Chapter 11. p. 255–264.

Multari S, Pihlava JM, Ollennu-Chuasam P, Yang B, Suomela JP. 2018. Identification and Quantification of Avenanthramides and Free and Bound Phenolic Acids in Eight Cultivars of Husked Oat (*Avena sativa* L.) from Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(11):2900–2908.

Pridal AA, Böttger W, Ross AB. 2018. Analysis of avenanthramides in oat products and estimation of avenanthramide intake in humans. *Food Chem* 253:93–100.

Riekkola ML, Hyötyläinen T. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. 2. painos, Yliopistopaino, Helsinki, 2002, 329 s.

Saari L. 2010. Kemiallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus. Kemian ja toksikologian tutkimusyksikkö, Evira.

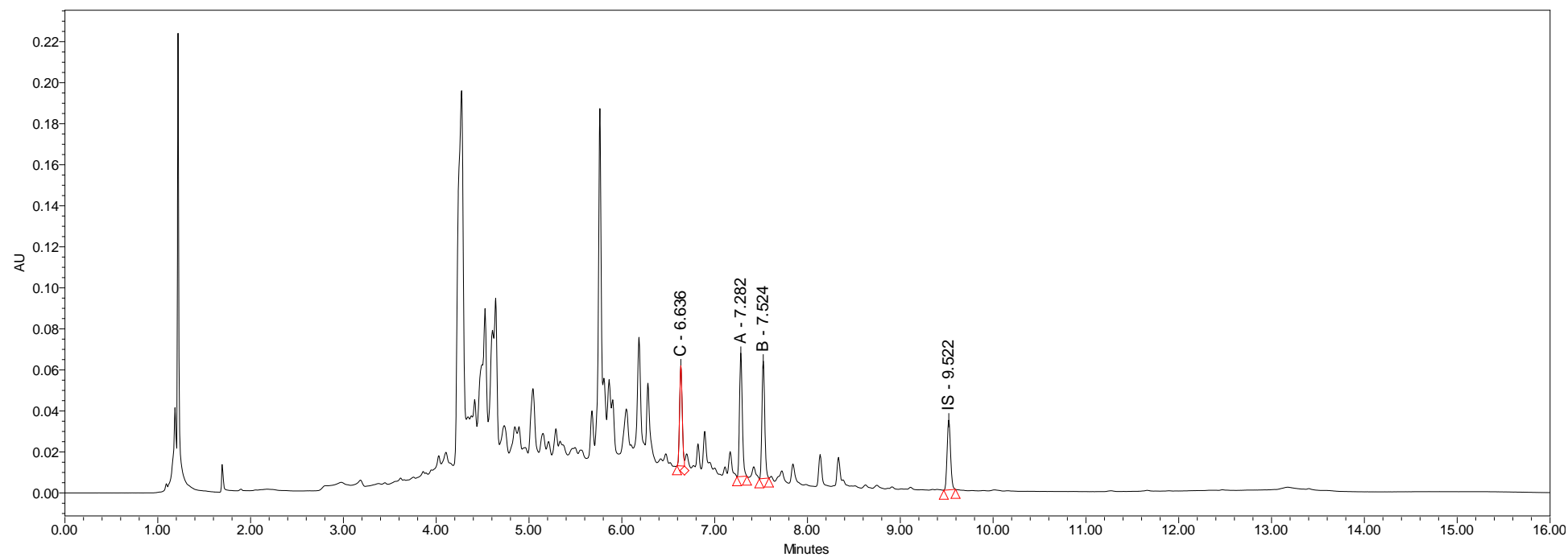
Talouselämä. 2019. Kauran tutkimiseen miljoonarahoitusta – "Kauratuotteille on nyt suuret vientimahdollisuudet". Saatavilla: <https://www.talouselama.fi/uutiset/kauran-tutkimiseen-miljoonarahoitus-kauratuotteille-on-nyt-suuret-vientimahdollisuudet/263d01d4-3d70-3010-a9d6-91ac61b1d506>. Tulostettu: 15.9.2019.

Wise ML. 2014. Avenanthramides: Chemistry and Biosynthesis. Teoksessa: *Oats Nutrition and Technology*. Yi Fang Chu. John Wiley & Sons, Ltd. Chapter 8. p. 195–226.

Xie Z, Mui T, Sintara M, Ou B, Johnson J, Chu Y, O'shea M, Kasturi P, Chen Y. 2017. Rapid quantitation of avenanthramides in oat-containing products by high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-TQMS). *Food Chem* 224:280–288.

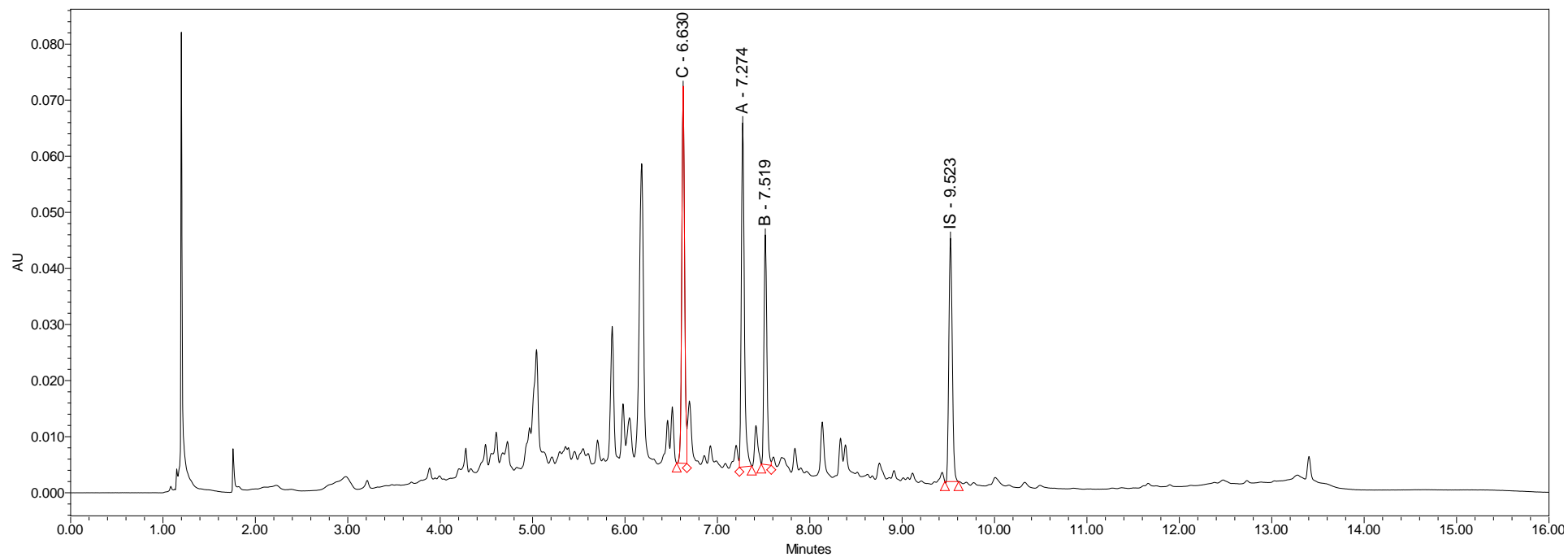
LIITTEET

Liite 1. Kaurajauhon UHPLC-kromatogrammi



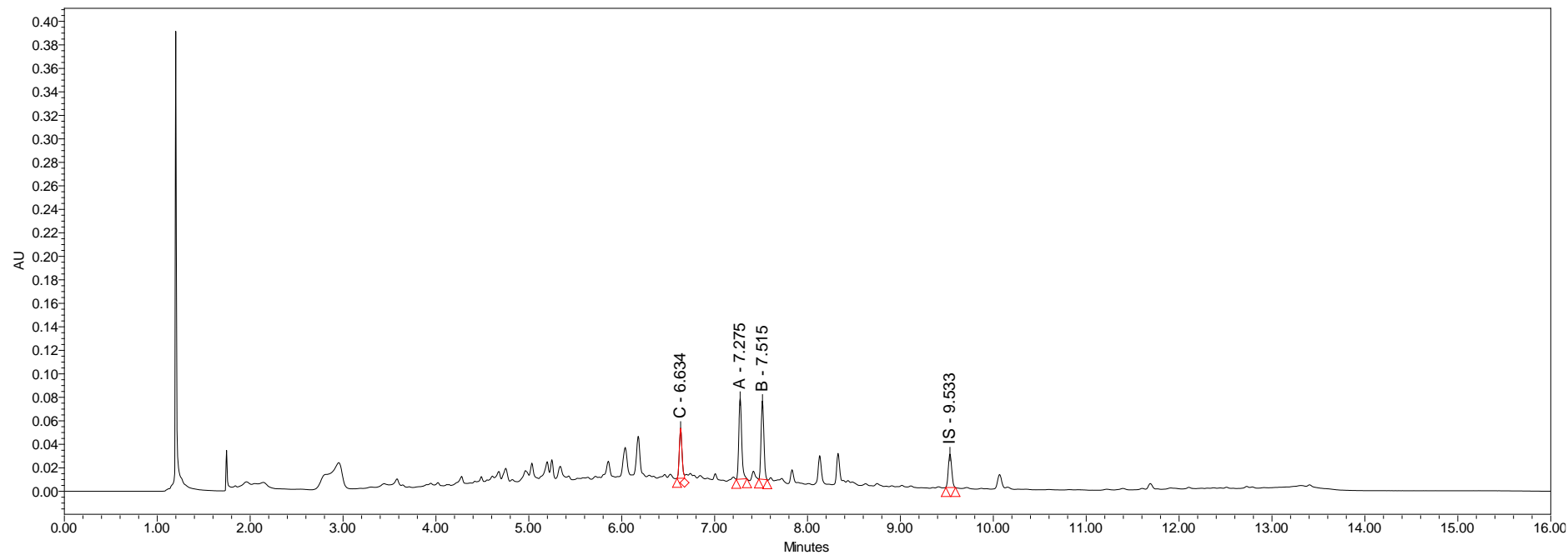
Kuva 1. Kaurajauhon UHPLC-kromatogrammi, 320 nm.

Liite 2. Kaurajogurtin UHPLC-kromatogrammi



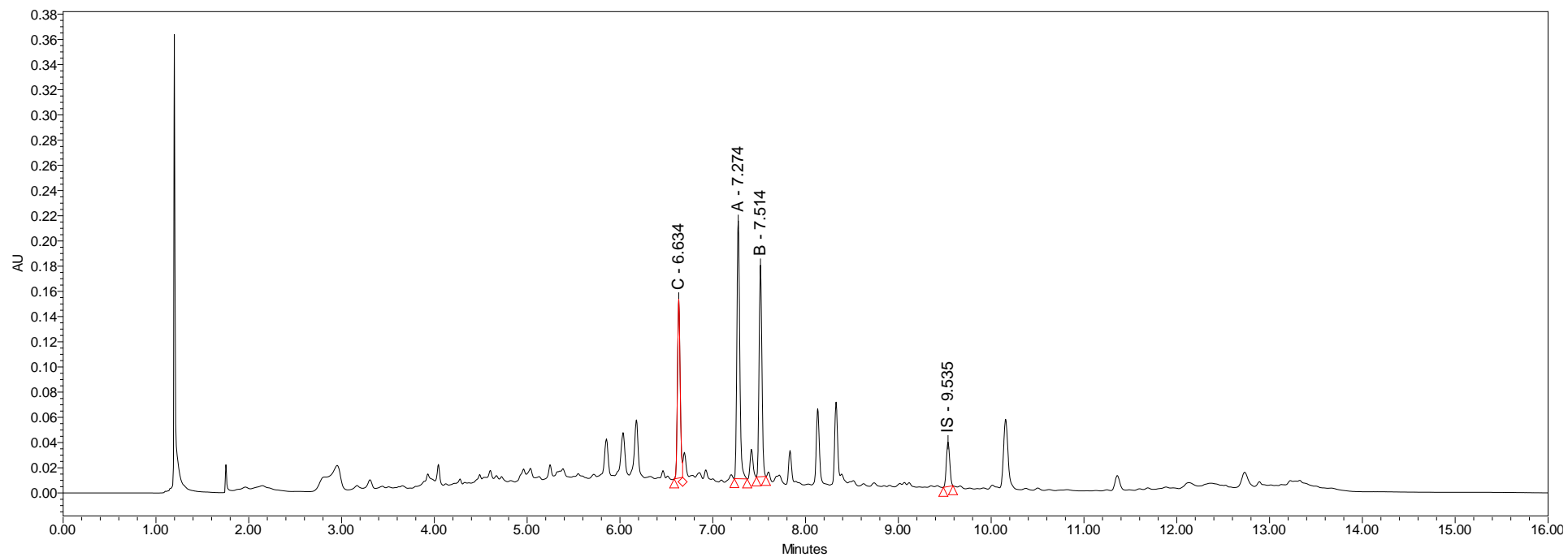
Kuva 1. Kaurajogurtin UHPLC-kromatogrammi, 320 nm.

Liite 3. Nyhtökauran UHPLC-kromatogrammi



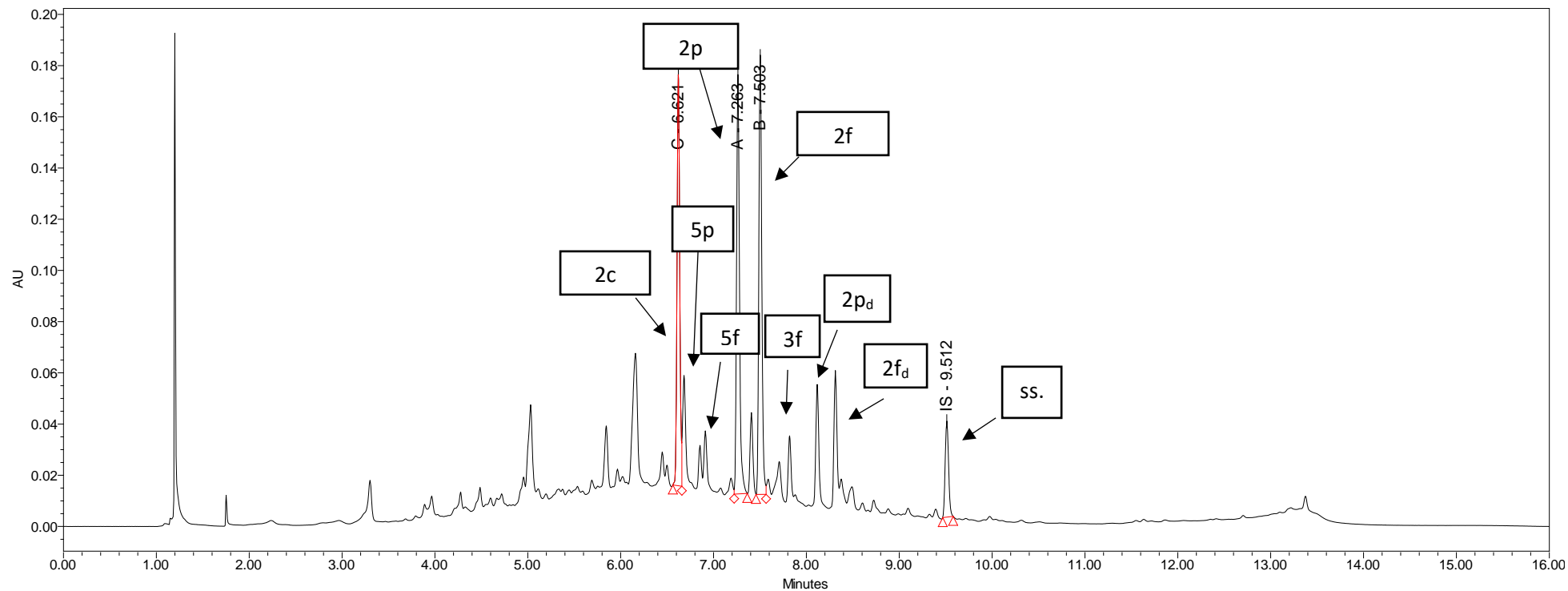
Kuva 1. Nyhtökauran UHPLC-kromatogrammi, 320 nm.

Liite 4. Kaurajauhiksen UHPLC-kromatogrammi



Kuva 1. Kaurajauhiksen UHPLC-kromatogrammi, 320 nm.

Liite 5. Kauraleseen UHPLC-kromatogrammi



Kuva 1. Kauraleseen UHPLC-kromatogrammi (320 nm), johon on merkitty tunnistetut avenantramidit.